**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS**

MARIA CAROLINA RODRIGUES VALERINO DA CUNHA

A melatonina na maturação *in vitro* de oócitos bovinos.

**Pirassununga
2014**

MARIA CAROLINA RODRIGUES VALERINO DA CUNHA

A melatonina na maturação *in vitro* de oócitos bovinos.

“Versão corrigida”

Dissertação apresentada à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Zootecnia.

Área de Concentração: Qualidade e Produtividade Animal.

Orientadora: Profa. Dra. Claudia Lima Verde Leal.

**Pirassununga
2014**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

Serviço de Biblioteca e Informação da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da
Universidade de São Paulo

C972a Cunha, Maria Carolina Rodrigues Valerino da
A melatonina maturação in vitro de oócitos bovinos /
Maria Carolina Rodrigues Valerino da Cunha. -- Pirassu-
nunga, 2014.
99 f.
Tese (Mestrado) -- Faculdade de Zootecnia e
Engenharia de Alimentos - Universidade de São Paulo.
Departamento de Medicina Veterinária.
Área de Concentração: Qualidade e Produtividade
Animal.
Orientadora: Profa. Dra. Claudia Lima Verde Leal.

1. Antioxidantes 2. Fragmentação nuclear 3. PCR
4. FSH 5. Meiose. I. Título.

Dedico este trabalho...

*Ao meu grande amor **Josiel Valerino da Cunha**, pelo incentivo constante na realização desse sonho. Por todo amor, carinho, paciência e providão dedicado a mim durante a realização do mesmo.*

*Aos meus queridos pais, **Antônio Carlos Rodrigues e Maria Zeni Cardozo Rodrigues**, por todo amor, carinho e sabedoria presente em nosso lar, cujos valores e virtudes contribuíram para as escolhas que fiz, sobretudo, acreditar na educação, quem me trouxe até aqui.*

*Às minhas queridas irmãs, **Lenita Rodrigues e Beatriz Rodrigues**, que tanto amo. Quem sempre torceu pela realização desse sonho.*

AGRADECIMENTOS

À Deus, Quem viu em meu coração o desejo de fazer ciência e me abençoou na realização desse sonho. Guardou-me e me capacitou ao ingresso da Universidade, e diante das dificuldades enfrentadas na pesquisa, me abraçou com seu amor, tornando-me forte para enfrentá-las com mérito.

À Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, por proporcionar a realização do curso de Mestrado.

À minha família, pelo apoio, incentivo e auxílio desde os primeiros momentos em que esse sonho começara a nascer em mim.

Ao meu amado esposo, meu grande companheiro, por sustentar essa minha dedicação à pesquisa, e acreditar nos frutos que colheremos juntos através desse tempo em que se fez presente na minha vida acadêmica. Em você encontro a força que me inspira permanecer caminhando na busca da realização de tantos outros sonhos.

À Profa. Dra. Claudia Lima Verde Leal, minha orientadora, quem acreditou em mim e abriu as portas para eu fazer ciência. A quem eu devo toda gratidão pelos seus ensinamentos, conselhos, apoio constante, disponibilidade, amizade e dedicação ao meu projeto de pesquisa. A quem eu sempre me espelharei como exemplo de profissionalismo, competência e grande amor a área acadêmica.

À Fernanda Cavallari Castro, minha irmãzinha nas rotinas do laboratório. Minha imensa gratidão por ter me acolhido de uma forma tão especial a casa em que passou a ser nossa durante esses três anos. Agradeço por compartilhar comigo o que o ser humano guarda de mais precioso em seu coração, o conhecimento... Conhecimentos básicos e ao mesmo tempo fundamentais, a mim necessários para que ao longo dessa jornada, eu pudesse caminhar com meus próprios passos e assim crescer, adquirir maturidade, ter a liberdade de decidir, optar por escolhas,

enfrentar os muitos espinhos... e hoje poder dizer que os venci. Meus sinceros agradecimentos pela atenção, paciência e disponibilidade dedicada a mim.

À Ligia Garcia Mesquita, pela atenção, paciência e disposição em me auxiliar. Agradeço de coração pela oportunidade de trabalhar contigo e reconhecer em você o exemplo de inteligência, competência, profissionalismo, dedicação à pesquisa, e acima de tudo, ser dona de um precioso coração disposto a me aconselhar, me acalmar, me fazer perseverar e crer no sonho que sonhei pra mim. Minha eterna gratidão por ter enfrentado ao meu lado os desafios da Biologia Molecular.

À minha querida amiga Gabriella Mamede, pela linda amizade construída no decorrer desses três anos. Sou muito grata pela oportunidade de ter convivido com quem carrega em seu ser um lindo coração, que em momentos de alegria me fez rir, sorrir... e em momentos de tristeza, soube me ouvir e me aconselhar com sábias palavras, as quais me tornaram fortes e me deram ânimo para recomeçar tantas vezes até que se vivenciasse o dia de hoje e se conquistasse essa vitória.

À minha querida amiga Gisele Gregui, pela agradável companhia ao longo desses três anos. Sou grata pela oportunidade de ter convivido com uma pessoa tão meiga, inteligente, competente, muito dedicada à pesquisa, e dona de um coração habitado por Deus. Meus agradecimentos por todo auxílio dispensado a mim nos momentos de dificuldade diária.

Às minhas amigas, Adja Medeiros, Camila Marques Bitencourt, Taise Toniazzi, Samira Melo, Brenda Barcelos, pela companhia que nos tornamos umas as outras logo no início do curso, quando ainda habitava em nossos seres o medo, a ansiedade, a preocupação... ora por estarmos distantes de nossos familiares, ora por estarmos sem auxílio financeiro, ora pela inexperiência da rotina da pesquisa, ora pela dificuldade em ser aprovada nas disciplinas... Minha sincera gratidão a nossa amizade, a qual me confortou a todos esses medos, me fortaleceu diante dos desafios a serem encontrados e me determinou permanecer na busca desse sonho, hoje realizado.

A todos os meus companheiros de trabalho do laboratório de Histologia, Hugo Fernandes, Katia Lancellotti Schwarz, Ramon Cesar Botigelli, Maria Helena Coelho Cruz e Fabiane Gilli Zaffalon, que sempre estiveram dispostos a me auxiliar no que ainda eu não tinha conhecimento, habilidade, competência.... e hoje tenho domínio.

À Fabiana Bressan, pela disposição em me auxiliar em vários momentos da minha pesquisa. Agradeço-te em especial pelo seu tempo, sua atenção e providão dedicados às ultimas análises do meu experimento, as quais me possibilitaram enriquecer os resultados anteriores e apresentá-los na forma deste trabalho.

Ao Paulo Fantinato, pelo auxílio e dedicação nas análises estatísticas. Muito obrigada.

Ao nosso funcionário Leonardo, pela disposição em viajar em busca do material biológico para este trabalho. Quantas tempestades chegou a vivenciar no caminho para nos proporcionar a realização de mais uma rotina na pesquisa. Também em períodos comemorativos, não deixou de nos auxiliar. Minha sincera gratidão a você.

Ao Prof. Dr. André Furugen Cesar de Andrade, responsável pelo Laboratório de Andrologia e Tecnologia de Embriões Suínos- LATES e suas alunas Mariana Andrade Torres e Gisele Mouro Ravagnani, por me possibilitarem o uso do microscópio de fluorescência. Em especial agradeço a aluna Mariana, pelo auxílio, disposição e dedicação as fotomicrografias do presente trabalho.

Ao professor Dr. Mario Binelli, responsável pelo Laboratório de Fisiologia e Endocrinologia Molecular, seus alunos Fernando Mesquita e Guilherme Pugliesi, também a professora Dra. Claudia Maria Bertan, pela colaboração dos ovários descartados, tornando- os de extrema importância e aproveitamento a minha pesquisa.

À CAPES, pela concessão da bolsa de estudos.

*“Cada um que passa em nossa vida, passa sozinho, pois cada pessoa é
única, e nenhuma substitui a outra.*

*Cada um que passa em nossa vida, passa sozinho, mas não vai
sozinho, nem nos deixa sós.*

Leva um pouco de nós mesmos, deixa um pouco de si mesmo.

Há os que levam muito.

Mas não há os que não levam nada

Há os que deixam muito.

Mas não há os que não deixam nada.

*Esta é a mais bela responsabilidade de nossa vida, a prova evidente
de que as pessoas não se aproximam por acaso.*

*O amor e a alegria são os elementos básicos para conquistarmos
amizades e as conservarmos.*

E são básicos, também, para nossa paz mental.

*Demonstrem amor e alegria em todas as oportunidades, e veja que a
paz nasce dentro de você.*

A felicidade não pode estar em nada que esteja fora de você.

*Busque-a dentro de você mesmo, pois a felicidade é Deus, e Deus mora
dentro de você.”*

(Antoine de Saint- Exupéry)

RESUMO

RODRIGUES-CUNHA, M. C. A melatonina na maturação *in vitro* de oócitos bovinos. 99 f. 2014. Dissertação (Mestrado)- Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2014.

Apesar do grande volume de pesquisas e dos avanços da produção *in vitro* (PIV) de embriões bovinos, a eficiência da técnica ainda está distante do desejável, principalmente quando comparada a embriões produzidos *in vivo*. A maturação *in vitro* é etapa importante da PIV, visto que a qualidade dos embriões é dependente da qualidade do oócito e, assim, modificações nas condições de maturação *in vitro* podem trazer avanços à produção de embriões. A melatonina é um hormônio que foi detectado no fluido folicular de humanos, suínos e, mais recentemente, de bovinos. Ainda, seus receptores foram localizados em oócitos e células da granulosa. Estudos *in vitro* apontam efeitos benéficos de sua utilização na maturação e cultivo *in vitro* de oócitos e embriões, embora os resultados sejam por vezes contraditórios. O presente trabalho teve por objetivo avaliar o efeito da melatonina na maturação *in vitro* (MIV) de oócitos bovinos e também seu potencial como indutor de genes de enzimas antioxidantes e inibidor de fragmentação nuclear em células do cumulus. Para tanto, complexos cumulus-oócitos (CCOs), obtidos de ovários de abatedouro, foram maturados *in vitro* na presença de melatonina (10^{-9} e 10^{-6} M), FSH (controle positivo) ou sem hormônios (controle negativo). As taxas de maturação nuclear foram avaliadas às 6, 12, 18 e 24 horas de cultivo (Experimento 1). No Experimento 2, os mesmos grupos experimentais foram avaliados quanto à abundância relativa de transcritos de genes de enzimas antioxidantes (Cu,ZnSOD, MnSOD e GPx) em oócitos e células do cumulus (24 horas de MIV) por PCR em tempo real. No Experimento 3 foi avaliado o efeito dos tratamentos sobre a fragmentação nuclear em células do cumulus pela técnica de TUNEL e citometria de fluxo (24 horas de MIV). A taxa de maturação avaliada às 6 h de MIV foi de 100% de oócitos imaturos em vesícula germinativa (VG) ($P>0,05$). Às 12 horas de cultivo foi observado o efeito da melatonina similar ao FSH, variando a proporção de oócitos em metáfase I (MI) de 54,0 a 80,7 % entre os grupos ($P<0,05$). Após 18 h de MIV observou-se que a maioria dos oócitos já havia

atingindo o estágio de metáfase II (MII) variando de 57,2 a 74,2 % ($P>0,05$). Após 24 h de MIV, observou-se que a maioria dos oócitos atingiu o estágio de MII (50,7 a 89,5%), sendo que a melatonina na maior concentração apresentou efeito similar ao da gonadotrofina ($P<0,05$). Em relação à expressão de enzimas antioxidantes em oócitos não houve efeito de nenhum tratamento ($P>0,05\%$). Já em células do cumulus houve maior expressão do MnSOD no grupo com FSH em relação ao grupo maturado sem hormônios ou imaturo ($P<0,05$). A melatonina nas diferentes concentrações apresentou efeito similar ao da gonadotrofina ($P>0,05$). Transcritos para a enzima Cu,ZnSOD foram mais abundantes em cumulus de CCOs maturados com a maior concentração de melatonina (10^{-6} M) em relação ao grupo imaturo ($P<0,05$), não havendo variação nos demais ($P>0,05$). GPX4 não foi afetado pelos tratamentos ($P>0,05$). A quantidade de células do cumulus com fragmentação nuclear não foi afetada por nenhum tratamento (33,4 a 41,5/10.000 células; $P>0,05$). Com base nestes resultados conclui-se que a melatonina nas concentrações avaliadas (10^{-9} e 10^{-6} M), embora seja capaz de estimular a maturação nuclear e induzir a expressão de alguns genes antioxidantes em células do bovino, ainda que de forma semelhante ao FSH, não provocou redução da fragmentação nuclear nestas células.

Palavras-chave: antioxidantes; fragmentação nuclear; PCR; FSH; meiose.

ABSTRACT

RODRIGUES-CUNHA, M. C. The melatonin on *in vitro* maturation of bovine oocytes. 2014. 99 f. M.Sc. Dissertation- Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2014.

Nevertheless the great volume of research and the advances in *in vitro* production (IVP) of bovine embryos, the efficiency of this technique is still beyond the desirable, specially when compared to embryos produced *in vivo*. *In vitro* maturation (IVM) is an important step in IVP, since the quality of embryos is dependent on the quality of oocytes, and, therefore, modifications to *in vitro* maturation conditions can bring improvements to embryo production. Melatonin is a hormone which has been detected in the follicular fluid of humans, pigs, and more recently, in bovine. Also, its receptors have been identified in oocytes and granulosa cells. Studies *in vitro* have shown that melatonin may have beneficial effects when used in oocyte maturation and embryo culture, although results are sometimes contradictory. The aim of the present work was to assess the effect of melatonin during IVM on nuclear maturation of bovine oocytes as well as its potential to induce expression of antioxidant enzymes and to reduce nuclear fragmentation in cumulus cells. Cumulus-oocyte complexes (COCs), obtained from abattoir ovaries, were matured *in vitro* in the presence of melatonin (10^{-9} e 10^{-6} M), FSH (positive control) or without hormones (negative control). Maturation rates were evaluated at 6, 12, 18 and 24 h (Experiment 1). In Experiment 2, the same groups were evaluated for the relative abundance of transcripts encoding antioxidant enzymes (Cu,ZnSOD, MnSOD and GPx) in oocytes and cumulus cells (24 h IVM) by real time PCR. In Experiment 3, the effect of treatments on nuclear fragmentation in cumulus cells was determined by TUNEL and flow cytometry (24 h IVM). At 6 h IVM, all oocytes were at immature germinal vesicle (GV) stage. After 12 h of culture the effect of melatonin was similar to that of FSH, with proportions of oocytes in metaphase I (MI) varying from 54.0 to 80.7% between groups ($P>0.05$). After 18 h IVM most oocytes had reached metaphase II (MII) stage (57.2 to 74.2%, $P>0.05$). At 24 h IVM, oocytes were also mostly in MII stage (50.7 to 89.5%), and the highest melatonin concentration was similar to the gonadotrophin ($P>0.05$).

Regarding expression of antioxidant enzymes in oocytes there was no effect of treatments for any of the genes ($P>0.05$). However, in cumulus cells MnSOD expression was higher in FSH compared with the groups matured without hormones or immature cells ($P<0.05$). Melatonin in both concentrations were similar to FSH ($P>0.05$). Transcripts for Cu,ZnSOD were more abundant in cumulus from COCs matured with the highest melatonin concentration (10^{-6} M) in relation to immature cells ($P<0.05$), but was not different from other groups ($P>0.05$). GPx was not affected by treatments ($P>0.05$). The number of nuclear fragmentation in cumulus cells was also not affected by treatments (33.4 to 41.5/10,000 cells; $P>0.05$). According to these results it is concluded that melatonin is able to induce meiosis resumption in oocytes (10^{-9} and 10^{-6} M) and expression of some antioxidant genes in bovine cumulus cells, similar to the effect of FSH, but was ineffective in reducing nuclear fragmentation in these cells.

Keywords: antioxidants; nuclear fragmentation; PCR; FSH; meiosis.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Corte transversal de ovário bovino. **A)** Na camada mais externa, encontra-se o córtex ovariano, constituído por folículos em diferentes fases de desenvolvimento; **B)** na porção mais interna localiza-se a medula ovariana; **C)** o corpo lúteo é uma estrutura morfológica presente no córtex ovariano como indicativo de ovulação do folículo..... 28
- Figura 2.** Estágios do desenvolvimento folicular nas fases pré - antral e antral..... 30
- Figura 3.** Dinâmica dos cromossomos durante a maturação nuclear e citoplasmática de oócitos bovinos. **A)** Detalhe do fuso meiótico em metáfase I; **B)** Detalhe do fuso meiótico em telófase I..... 33
- Figura 4.** Biossíntese da melatonina. A síntese da hidroxitriptamina a partir do triptofano está estimulada pela luz, no entanto a atividade da enzima N-acetiltransferase (NAT) é estimulada pelo escuro..... 41
- Figura 5.** **A)** Aspiração de folículo ovariano bovino oriundo de abatedouro com seringa e agulha 18G. **B)** Oócitos com cumulus compacto com pelo menos 3- 4 camadas de células e citoplasma uniforme (graus I e II)..... 51
- Figura 6.** Fotomicrografia de oócito bovino em estágio de vesícula germinativa (VG). **A** e **C.** Cromatina descondensada, método de coloração DAPI; **B** e **D.** Presença de núcleo vesicular. Método de coloração Anti-lamina A/C. As setas apontam para a vesícula germinativa..... 53

Figura 7. Fotomicrografia de oócito bovino nos estágios MI (A e B) e MII (C e D). A. Cromossomos com grau mais avançado de condensação; B. Cromossomos formando a placa equatorial; C e D. Grupos densos de cromossomos, formando o primeiro corpúsculo polar. Método de coloração Hoechst 33342. A seta aponta para a formação do primeiro corpúsculo polar.....	54
Figura 8. Curva padrão de amplificação para o gene Zn,CuSOD, por PCR em tempo real para células do cumulus em diluições seriadas de 1:4....	58
Figura 9. Em A e B: Cálculo da eficiência dos genes β actina e Zn,CuSOD baseado no <i>slope</i> . C: Diferença de CT dos dois genes em estudo para a validação da comparação relativa entre ambos.....	59
Figura 10. Esquema da técnica de TUNEL. Quando ocorre a quebra do DNA nas regiões internuclossomais ocasionado pela apoptose, há exposição dos radicais 3' - OH. A enzima terminal desoxynucleotidyl transferase (TdT) catalisa a polimerização da extremidade 3', da união das caudas poli A com o conjugado fluorescente (FITC) e cauda poli- U, o qual sinalizará a fluorescência das quebras das fitas de DNA.....	61
Figura 11. Análise em citometria de fluxo da frequência dos núcleos positivos (fragmentação no DNA) das células do cumulus marcadas pelo conjugado fluorescente FITC nos grupos: A) C ⁺ tratado com a solução de DNase + solução enzimática (enzima terminal deoxinucleotídeotransferase) + solução marcadora (conjugado fluorescente de dUTP; livre de enzima); B) C ⁻ tratado apenas com solução marcadora.....	61

Figura 12. Abundância relativa dos transcritos de MnSOD em oócitos e células do cumulus após maturação *in vitro* (24h) nos diferentes tratamentos..... 66

Figura 13. Abundância relativa dos transcritos de Cu,ZnSOD em oócitos e cumulus após maturação *in vitro* (24h) nos diferentes tratamentos..... 68

Figura 14. Abundância relativa dos transcritos de GPx4 em oócitos e células do cumulus após maturação *in vitro* (24h) nos diferentes tratamentos..... 68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Oligonucleotídeos iniciadores e condições de termociclagem dos genes relacionados à proteção celular (antioxidantes).....	57
Tabela 2. Seqüência dos oligonucleotídeos iniciadores dos genes relacionados à proteção celular (antioxidantes).....	57
Tabela 3. Estádio de maturação nuclear de oócitos maturados <i>in vitro</i> durante 12 h nos diferentes tratamentos.....	64
Tabela 4. Estádio de maturação nuclear de oócitos maturados <i>in vitro</i> durante 18 h nos diferentes tratamentos.....	65
Tabela 5. Estádio de maturação nuclear de oócitos maturados <i>in vitro</i> durante 24 h nos diferentes tratamentos.....	66
Tabela 6. Proporção de fragmentação internucleossômica do DNA pela técnica de Tunel nas células do cumulus submetidas à maturação <i>in vitro</i> no período de 24 horas.....	69

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AANAT	N – acetiltransferase
AI	Anáfase I
AFMK	N2 – Acetyl – N1 – formyl – 5 - methoxykynuramine
AMK	N1 – acetyl – 5 – methoxykynuramine
ASMT	Acetilserotonina O – metiltransferase
ATP	Adenosina trifosfato
B199	TCM 199, Sais de Earle e 20 mM de bicarbonate de sódio
CCO	Complexos cumulus – oócitos
cDNA	DNA complementar
CG	Células da granulosa
CON⁺	Controle positivo
CON⁻	Controle negativo
CO2	Dióxido de carbono
CuZnSOD	Cobre, Zinco Superóxido dismutase
DEPC	Dimetil pirocarbonato
DNA	Ácido desoxirribonucléico
ERN	Espécies reativas de nitrogênio
ERO	Espécies reativas de oxigênio
FITC	Conjugado fluorescente
FIV	Fecundação <i>in vitro</i>
FSH	Hormônio folículo estimulante
GJ	<i>Gaps junctions</i> (junções comunicantes)
GPX4	Glutathione peroxidase
H199	Hepes
LH	Hormônio luteinizante
MAPK	Proteína cinase ativada por mitógenos
MIV	Maturação <i>in vitro</i>
MnSOD	Managanês superóxido dismutase
MPF	Fator promotor de maturação
MI	Metáfase I

MII	Metáfase II
NaCl	Solução fisiológica
NAS	N – acetil serotonina
O2	Oxigênio
PBS*	Solução salina fosfatada livre de Ca ⁺ e Mg ⁺ acrescido de 0,1% de PVA
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PIV	Produção <i>in vitro</i>
PKA	Proteína cinase dependente de AMPc
PVA	Álcool polivilínico
RNase Out	Recombinat Ribonuclease Inhibitor
RVG	Rompimento da vesícula germinativa
TI	Telófase I
TdT	Terminal desoxynucleotidyl transferase
TUNEL	Terminal deoxinucleotil transferase Uracil Nick End Labeling
T-5-H	Triptofano-5-hidroxilase
VG	Vesícula germinativa
1º CP	1º Corpúsculo polar
5-HTD	5 – hidroxitriptofano descarboxilase
6-HMEL	6 – hidroximelatonina
9M	Melatonina 10 ⁻⁹ M
6M	Melatonina 10 ⁻⁶ M

LISTA DE UNIDADES E SÍMBOLOS

mm	milímetro
μm	micrômetro
%	porcentagem
μg	micrograma
mL	mililitro
ng	nanograma
mg	miligrama
°C	graus Celcius
mM	milimolar
μL	microlitro
h	hora
min	minuto
nm	nanômetro
U	unidade

SUMÁRIO

CAPÍTULO I: INTRODUÇÃO

1 Introdução.....	23
1.1 Hipótese e objetivos.....	26
1.1.2 Hipótese.....	26
1.1.3 Objetivos.....	26
1.1.3.1 Objetivos gerais.....	26
1.1.3.2 Objetivos específicos.....	26

CAPÍTULO II: REVISÃO DE LITERATURA

2 Revisão de Literatura.....	28
2.1 Reprodução da fêmea.....	28
2.1.1 Ovário.....	28
2.1.2 Foliculogênese.....	29
2.1.3 Oogênese.....	31
2.1.3.1 Maturação nuclear.....	32
2.1.3.2 Maturação citoplasmática.....	34
2.1.4 Cumulus oophorus e células da granulosa.....	34
2.2 Sistema de cultivo <i>in vitro</i>	36
2.2.1 Maturação <i>in vitro</i>	36
2.2.2 Estresse oxidativo durante a MIV.....	37
2.2.3 Antioxidantes.....	38
2.3 Melatonina.....	39
2.3.1 Função hormonal.....	39
2.3.2 Síntese da melatonina.....	40
2.3.3 Receptores da melatonina.....	41
2.3.4 Ação antioxidante e antiapoptótica.....	42
2.3.5 Melatonina na maturação e cultivo <i>in vitro</i>	44

CAPÍTULO III: DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

3 Delineamento experimental.....	47
----------------------------------	----

CAPÍTULO IV: MATERIAL E MÉTODOS

4 Material e métodos.....	50
4.1 Local do experimento.....	50
4.2 Coleta dos complexos cumulus-oócitos (CCOs).....	50
4.3 Maturação <i>in vitro</i>	51
4.4 Avaliação da taxa de maturação dos oócitos.....	52
4.4.1 Coloração com Anti-lamina A/C e DAPI.....	52
4.4.2 Coloração com Hoechst 33342.....	52
4.4.3 Classificação do estágio da meiose dos oócitos.....	53
4.5 PCR em Tempo Real.....	54
4.5.1 Congelamento e armazenamento dos oócitos e células do cumulus para análise de transcritos por PCR.....	54
4.5.2 Extração do RNA total de oócitos e células do cumulus pelo método Trizol®.....	55
4.5.3 Digestão com DNase I.....	55
4.5.4 Transcrição reversa.....	56
4.5.5 Expressão dos genes pelo PCR em Tempo real.....	56
4.5.6 Análise dos dados do PCR.....	57
4.6 Fragmentação nuclear em células do cumulus e citometria de fluxo....	59
4.7 Análise estatística.....	62

CAPÍTULO V: RESULTADOS

5 Resultados.....	64
5.1 Avaliação do efeito da melatonina na maturação nuclear.....	64
5.2 Determinação do efeito da melatonina na abundância relativa de transcritos dos genes antioxidantes em oócitos e células do cumulus.....	66
5.3 Determinação do efeito da melatonina sobre a proporção de células do cumulus apresentando fragmentação nuclear (Tunel).....	69

CAPÍTULO VI: RESUMO DOS RESULTADOS

6 Resumo dos resultados.....	71
------------------------------	----

CAPÍTULO VII: DISCUSSÃO

7 Discussão.....	73
------------------	----

CAPÍTULO VIII: CONCLUSÕES

8 Conclusões.....	81
-------------------	----

Anexo.....	83
------------	----

CAPÍTULO IX: REFERÊNCIAS

9 Referências.....	85
--------------------	----

CAPÍTULO I
INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

De acordo com relatórios fornecidos pela Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões (SBTE), a produção de embriões bovinos no Brasil aumentou significativamente na última década. Este aumento está diretamente relacionado com a expansão da produção *in vitro* (LOIOLA, 2013), uma das biotecnologias que mais vem se aprimorando e expandindo, devido ao grande potencial para a produção comercial de embriões em larga escala e para a realização de técnicas afins como a transferência de núcleo, importantes para as atuais estratégias de seleção (EMANUELLI, 2005) e obtenção de mais descendentes de animais geneticamente superiores (VIANA et al., 2010; GRUPEN, 2013).

Apesar da extensa dedicação às pesquisas e aos avanços dessa biotecnologia, a produção de embriões bovinos *in vitro* ainda está aquém do desejável, principalmente em comparação com embriões produzidos *in vivo*. A competência de oócitos obtidos de folículos em crescimento e maturados *in vitro* é mais baixa que aquela de oócitos maturados *in vivo* (RIZOS et al., 2002).

A produção *in vitro* (PIV) é desenvolvida rotineiramente em laboratórios de pesquisa e comerciais, e envolve uma série de etapas que vão desde a obtenção, seleção e maturação de oócitos *in vitro* (MIV), seguida da fecundação *in vitro* (FIV) dos mesmos, e por fim, o cultivo dos embriões obtidos *in vitro* até o estágio de blastocisto para a transferência a receptoras sincronizadas ou congelamento para transferência futura (VARAGO et al., 2008).

Embora seja frequente a aplicação da PIV em bovinos, tal ferramenta apresenta dentre os efeitos indesejáveis da manipulação dos oócitos, a eficiência relativamente baixa da técnica, maior incidência de distúrbios do crescimento e do desenvolvimento e alta mortalidade embrionária (PORCIUNCULA, 2007). Apesar de essa biotécnica ser uma tecnologia na qual a maturação e a fecundação prossigam de forma aparentemente normal, a proporção de embriões bovinos que alcançam o estágio de blastocisto dificilmente é superior a 40%, além de

apresentarem grande possibilidade de comprometimento em qualidade e competência para se desenvolver (VELHO, 2011).

Dentre os principais desafios que persistem no campo da biologia da reprodução está a compreensão da natureza dos processos celulares e moleculares que determinam a qualidade dos oócitos, sendo um dos principais fenômenos a ser compreendido a aquisição da competência do oócito, bem como o papel desempenhado pelo ambiente folicular que o circunda sobre o seu potencial de desenvolvimento.

Lonergan et al (2001) e Rizos et al (2002), levantaram indícios de que as taxas de desenvolvimento de embriões PIV estariam relacionadas à qualidade intrínseca dos oócitos obtidos e a qualidade dos embriões às condições de cultivo *in vitro*. Dessa forma, as condições do meio de MIV na produção de embriões bovinos podem exercer papel relevante (DIELEMAN et al., 2002) sobre o desenvolvimento competente do oócito e do embrião resultante, incluindo efeitos sobre os estágios da maturação nuclear e as taxas de clivagem e de blastocistos produzidos (KNIJIN et al, 2003), sugerindo que modificações nos meios e protocolos de maturação *in vitro* possam ser feitas, a fim de otimizar a competência do oócito e as taxas de desenvolvimento embrionário subsequente (VELHO, 2011).

A melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina) é uma indolamina produzida a partir do aminoácido triptofano, principalmente na glândula pineal, como também em outros locais: retina, glândula lacrimal extra-orbitária, trato gastrointestinal, pele e ovário (HARDELAND et al., 1993; ITOH et al., 1999). A melatonina foi detectada no fluido folicular de humanos, suínos e, mais recentemente por Coelho et al (2013) também em bovinos, e seus receptores foram localizados em oócitos e células da granulosa. Estudos *in vitro* apontam efeitos benéficos de sua utilização na maturação e cultivo *in vitro* de oócitos e embriões, embora os resultados sejam por vezes contraditórios. Este hormônio desempenha papel importante em diversas ações fisiológicas devido às suas propriedades imunomoduladoras e citoprotetoras (CLAUSTRAT, 2005; PANDI-PERUMAL, 2006). Como antioxidante, ela é capaz de mobilizar mecanismos reparadores do DNA (BURKHARDT, et al., 2001), regular diretamente a ação de diversas enzimas, o metabolismo oxidativo e o transporte de elétrons (REITER et al., 2004), sendo, portanto, importante intermediária durante o processo de apoptose celular (MAYO, et al., 1998).

Entretanto, são poucos os estudos envolvendo o papel da melatonina sobre os processos da reprodução bovina utilizando técnicas *in vitro*, e os resultados apresentados na literatura ainda são controversos. Assim, o estudo do papel que a melatonina desempenha em oócitos bovinos durante a maturação *in vitro*, possibilitará a obtenção de mais conhecimentos que contribuam para o desenvolvimento de protocolos mais adequados de MIV e, conseqüentemente, melhorias nas taxas de desenvolvimento e/ou qualidade dos embriões gerados por PIV.

1.1 Hipótese e Objetivos

1.1.2. Hipótese

A hipótese deste trabalho foi que a melatonina estimula a maturação *in vitro* e apresenta propriedade citoprotetora (antioxidante e antiapoptótica) em complexos cumulus-oócitos bovinos.

1.1.3. Objetivos

1.1.3.1. Objetivo geral

Estudar o efeito da melatonina durante a maturação *in vitro* (MIV) de oócitos bovinos e o seu efeito protetor (antioxidante e antiapoptótico) em complexos cumulus-oócitos bovinos.

1.1.3.2. Objetivos específicos

- a) Avaliar o efeito da adição de melatonina na progressão da maturação nuclear durante a MIV;
- b) Investigar o efeito da melatonina durante a MIV na expressão de genes antioxidantes (Cu,ZnSOD, MnSOD e GPx) em oócitos e células do cumulus;
- c) Determinar o efeito da melatonina durante a MIV na proporção de células do cumulus apresentando fragmentação nuclear (TUNEL).

CAPÍTULO II
REVISÃO DE LITERATURA

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Reprodução na fêmea

2.1.1. O ovário

O ovário é um órgão essencial na reprodução. Ele é constituído de duas camadas, uma externa, parenquimatosa, que é o córtex ovariano, e outra interna, vascular, a medula. O córtex é constituído por folículos ovarianos, corpo lúteo (dependendo da fase reprodutiva da fêmea) e pelo estroma de sustentação com seus vasos sanguíneos e linfáticos (figura1). A porção externa do córtex tem uma camada de tecido conjuntivo denso, a túnica albugínea ovariana, localizada entre a porção externa do córtex e o epitélio germinativo.

Figura 1. Corte transversal de ovário bovino. **A)** Na camada mais externa, encontra-se o córtex ovariano, constituído por folículos em diferentes fases de desenvolvimento; **B)** na porção mais interna localiza-se a medula ovariana; **C)** o corpo lúteo é uma estrutura morfológica presente no córtex ovariano como indicativo de ovulação do folículo.

A camada medular do ovário consiste em vasos sangüíneos e linfáticos, nervos e tecido conjuntivo de sustentação. Na porção adjacente ao hilo, na extremidade tubárica do ovário, está localizada a rede ovariana, talvez envolvida na organização estrutural da gônada durante a vida embrionária e modulação da meiose das células germinativas (NASCIMENTO e SANTOS, 2003 *apud* RAMOS, 2008).

Tal anatomia e morfologia celular estão associadas ao desempenho de suas funções endócrinas e gametogênicas (FRANDSON, 1981), cujo duplo papel é complementar, interdependente e necessário para o sucesso da reprodução (McDONALD, 1989; HAFEZ e HAFEZ, 2004).

2.1.2. Foliculogênese

O desenvolvimento folicular ovariano pode ser definido como o processo de formação, crescimento e maturação folicular, iniciando com a formação do folículo primordial e culminando com o estágio de folículo maduro, também conhecido como folículo de De Graaf ou pré-ovulatório ou dominante (VAN DEN HURK e ZHAO, 2005).

O folículo é uma das unidades funcionais do ovário, responsável pela produção de hormônios, e com função de favorecer um micro-ambiente para o crescimento do oócito (GORDON, 1994). Trata-se de uma estrutura bastante complexa, composta de tipos distintos de células somáticas, além da célula germinal, as quais mantêm uma íntima associação durante todo o desenvolvimento primordial até os estágios pré-ovulatórios (DE LOOS et al., 1991).

O menor folículo é o folículo primordial, constituído por um oócito central rodeado por uma camada simples de células da granulosa (CG) achatadas. Assim que se forma uma camada completa de células da granulosa cubóides ao redor do oócito (11-20 CG), ele se torna um folículo primário. O aparecimento de uma segunda camada de células da granulosa caracteriza o folículo secundário (DRIANCOURT, 1991), e está associado ao reinício da síntese de RNA pelo oócito (FAIR et al., 1997). Esses folículos são componentes do estoque de reserva que serão usados ao longo da vida reprodutiva. Eles estão localizados na periferia do córtex ovariano e formam a maior parte dos folículos contidos nos ovários (>95%).

Em grandes folículos secundários, o aparecimento de uma camada glicoprotéica denominada zona pelúcida pode ser notada ao redor do oócito. O folículo ovariano terciário ou antral de mamíferos pode ocorrer quando um folículo secundário atinge de 2 a 7 camadas de CG e se caracteriza pela presença de uma cavidade, o antro, preenchida de líquido folicular. Esse estágio coincide com a proliferação e diferenciação das células que rodeiam o oócito (figura 2). O folículo terciário tem na sua periferia, a teca externa e em seguida a teca interna com a lâmina basal limitando-se com as células da granulosa. Observa-se ainda uma população especializada de células da granulosa, chamada células do cumulus; o antro com líquido folicular de composição química semelhante a do sangue; e numerosas comunicações intercelulares, as *gap junctions* (junções comunicantes ou junções *gap*), que estão presentes entre as células da teca, da granulosa e entre as células do cumulus e o oócito (RAMOS, 2008). Tais comunicações permanecem durante as fases de maturação do oócito, e são cruciais tanto para o crescimento e diferenciação do oócito como para a função das células do cumulus, permitindo o sucesso do processo da oogênese (VELHO, 2011), e a aquisição da competência meiótica (CANIPARI et al., 1984).

Figura 2. Estágios do desenvolvimento folicular nas fases pré - antral e antral (ROCHA et al., 2011).

A atividade transcricional continua até o folículo alcançar 2-3 milímetros e o oócito um diâmetro de aproximadamente 110 μm (FAIR, 1996). Em seguida, os oócitos dos folículos terciários cessam seu crescimento, com a proliferação celular,

o crescimento da cavidade antral e o acúmulo de líquido folicular. Em bovinos, estes folículos crescem de tamanho até alcançarem 8-9 mm, momento em que apenas um folículo, denominado de folículo dominante, continua seu crescimento enquanto que os demais cessam seu crescimento e regredem por atresia (SAVIO, et al., 1988). O oócito sofre significantes modulações quando está incluso no folículo dominante, especialmente em relação à sua ultraestrutura e atividades funcionais, as quais atribuem ao folículo o desempenho de papel fundamental na aquisição da plena competência do desenvolvimento do oócito, uma vez que ele o atinge sua capacidade plena ou “capacitação oocitária” (HYTTEL et al., 1997), de relevante importância na aquisição da competência oocitária (BREVINI-GANDOLFI et al, 1997; GANDOLFI, 2001).

Oócitos meioticamente competentes são mantidos no estágio de vesícula germinativa (VG) no ambiente folicular até que ocorra uma onda pré-ovulatória de gonadotrofinas e estimule a maturação do oócito (VAN DER HURK e ZHAO, 2003).

2.1.3. Oogênese

A oogênese ocorre no início da vida fetal com o desenvolvimento do oócito e do folículo (BAKER et al., 1972) e consiste na formação das células germinativas primordiais, cuja origem é extragonadal (WASSARMAN E ALBERTINI, 1994), e na diferenciação destas até a formação do oócito haplóide após a fecundação (RÜSSE, 1983).

Em bovinos, aos trinta dias de gestação, as células germinativas migram para o mesênquima da crista genital juntamente com as células somáticas e sofrem uma alta frequência de divisões mitóticas, transformando-se em cerca de 2.700.000 oogônias no dia 110 da gestação (ERICKSON, 1966). Ao final da proliferação mitótica, as oogônias entram em meiose e diferenciam-se em oócitos (HIRSHFIELD, 1991), dentre os quais, alguns já iniciam a primeira prófase meiótica, passando então pelos estádios de leptóteno, zigóteno, paquíteno e diplóteno. Neste último, o oócito organiza seu núcleo em vesícula germinativa (VG), caracterizando o primeiro bloqueio da meiose (RICHARDS et al., 1980).

O reinício da meiose ocorre de maneira gradual, no decorrer da vida reprodutiva do animal, quando o folículo e o seu respectivo oócito podem entrar em

atresia ou serem recrutados para uma onda folicular que culmina com ovulação (EMANUELLE, 2005).

2.1.3.1. Maturação nuclear

A maturação oocitária está relacionada a uma sequência de mudanças sofridas pelo gameta feminino, que envolvem transformações nucleares e citoplasmáticas, as quais permitem ao oócito a sua fecundação normal e o desenvolvimento embrionário subsequente. (MATZUK, 2002). Trata-se de um processo pelo qual o oócito completa sua primeira divisão meiótica progredindo até o estágio da metáfase II (MEHLLMANN, 2005), sendo a quebra da vesícula germinativa (VG) o primeiro sinal morfológico visível dessa retomada da meiose.

A maturação nuclear é caracterizada pelo oócito atingir o estágio de metáfase II (MII), sendo regulada por fatores presentes no fluido folicular, pela interação dos oócitos e células foliculares, bem como por fatores endócrinos, tais como as gonadotrofinas (KIM et al., 2008). Esses fatores influenciam no crescimento do oócito e aumento de volume do fluido folicular, possibilitando a capacidade do oócito sofrer a quebra da vesícula germinativa.

Em bovinos, oócitos de 115 μm podem alcançar o rompimento da vesícula germinativa (RVG), mas, para adquirir capacidade de desenvolvimento embrionário, devem estar com diâmetro superior a 120 μm (EPPIG e SCHROEDER, 1989; PAVLOK et al., 1992). Os oócitos devem também alcançar aproximadamente 80% do seu tamanho final para tornarem-se aptos a recomeçar a meiose (SZOLLOSI, 1993).

O rompimento da vesícula germinativa ocorre no folículo ovulatório, após o pico do hormônio luteinizante (LH). O bloqueio meiótico do estágio de diplóteno (VG) é mantido pelas altas concentrações do AMP cíclico que é produzido pelas células da granulosa e transportado para o oócito via junções *gap*. Após a puberdade, uma onda de LH causa o declínio do AMP cíclico, primeiro pelo desacoplamento das junções *gap* (GJ) entre oócito e células da granulosa e depois pela redução de sua síntese pelas células (KAWAMURA et al., 2004). O declínio do AMP cíclico provoca a desfosforilação e consequente ativação do complexo fator promotor da maturação/meiose (MPF) (MILLER e RUSSELL, 1992), que, por sua vez, está envolvido em vários eventos nucleares e citoplasmáticos. As

alterações morfológicas observadas envolvem a condensação dos cromossomos, o desaparecimento do nucléolo, a desintegração da membrana celular e o rompimento do envelope nuclear (VG) (KUBELKA et al., 2000). Posteriormente, o oócito passa pelo estágio de diacinese, seguido da metáfase I (MI), anáfase I (AI) e telófase I (TI) completando a primeira divisão meiótica, e em seguida, os cromossomos homólogos se separam, formam o primeiro corpúsculo polar e se alinham no centro do fuso, caracterizando o estágio de metáfase II (SIRARD et al., 1992) (figura 3). Nesse momento a meiose é interrompida no denominado segundo bloqueio meiótico (metáfase da meiose II), e o reinício é uma consequência natural pela fecundação do espermatozóide ou por ativação partenogenética (GORDON, 1994).

Em bovinos, o RVG ocorre de 8-12 horas, a MI de 12-15 horas, a AI e a TI 15-18 horas e a MII de 18-22 horas após o pico de LH, e em sistemas de cultivo *in vitro*, ocorre espontaneamente a partir da retirada do oócito do folículo.

Figura 3. Dinâmica dos cromossomos durante a maturação nuclear e citoplasmática de oócitos bovinos. **A)** Detalhe do fuso meiótico em metáfase I; **B)** Detalhe do fuso meiótico em telófase I (FERREIRA et al., 2009).

2.1.3.2. Maturação citoplasmática

A maturação nuclear completa não é suficiente para garantir a qualidade do oócito para a fecundação e desenvolvimento de um embrião. Assim, a maturação citoplasmática também desempenha importante papel na competência do oócito através de sua sincronização com a maturação nuclear (EPPIG, 1994), possibilitando o sucesso nos processos de maturação, fecundação e início da embriogênese (FERREIRA et al., 2009).

A maturação citoplasmática compreende as mudanças citoplasmáticas ultra-estruturais que ocorrem no oócito, desde o estágio de VG até o final da MII (Figura 3) e é necessária para a obtenção de condições de bloqueio da polispermia, para descondensar o núcleo do espermatozóide e formar o pró-núcleo masculino após a fecundação (PICKTON et al., 1998).

Pode-se considerar a maturação citoplasmática em mamíferos, como o conjunto de processos pelo qual o oócito passa a fim de se tornar uma célula capaz de fecundar e dar suporte ao desenvolvimento embrionário inicial, sendo necessária uma série de mudanças durante o desenvolvimento do oócito: a) formação das junções comunicantes entre o oócito e suas células somáticas circundantes, b) desenvolvimento e deslocamento do complexo de Golgi para a periferia do oócito, c) desenvolvimento do retículo endoplasmático liso, d) estocagem de proteínas, RNAs mensageiros e fatores de transcrição, h) formação da zona pelúcida, i) alteração na posição das mitocôndrias e dos grânulos corticais; sendo este último, o sinal mais visível da maturação citoplasmática (FAIR et al., 1995; HYTTTEL et al., 1997; ANGUITA et al., 2007).

Em muitos sistemas de cultivo *in vitro* ocorre a assincronia entre eventos e os processos que envolvem a maturação nuclear, o que compromete o desenvolvimento embrionário e contribui para a queda na proporção de oócitos que chega ao estágio de blastocisto (30-40%), comparados aos que atingem maturação nuclear (80%) (BLODIN e SIRARD, 1995).

2.1.4. Cumulus oophorus e células da granulosa

A formação do antro folicular subdivide as células da granulosa em duas populações distintas tanto espacialmente quanto funcionalmente: as células do

cumulus oophorus, e as células da granulosa parietal. As células do *cumulus oophorus* (em torno de 1000 por folículo) estão intimamente próximas ao oócito, enquanto que as células da granulosa parietal (aproximadamente 50.000 por folículo) formam a parede interna do folículo (SALUSTRI et al., 1990).

As células do cumulus e as células da granulosa parietal diferem morfológicamente, e há evidências de que o oócito desempenhe um papel decisivo na determinação e destino dessas células somáticas, através da secreção de fatores que promovem a sua proliferação (EPPIG, 1991), e regulam seu metabolismo e secreção (LI et al., 2000 *apud* VELHO, 2011).

Durante o processo de maturação do oócito as células do cumulus secretam ácido hialurônico que se acumula entre as células formando uma matriz gelatinosa, o que constitui o processo conhecido como expansão do cumulus (EPPIG, 1989; HESS et al., 1999). O sucesso da fertilização está diretamente relacionado à composição e capacidade funcional da matriz do cumulus, como demonstrado por estudos em animais *knockout* para os genes COX2, TSG6 e PTX3, necessários à expansão, e também demonstrado por outras abordagens que inibiram a expansão, organização e funcionalidade das proteínas da matriz do cumulus (LIM et al., 1997).

Através de um sincício mediado por junções comunicantes entre as células do cumulus e as células da granulosa parietal, as células da granulosa favorecem o crescimento dos oócitos através do fornecimento de nutrientes (VAN SOOM et al., 2002); desempenham papel fundamental no processo meiótico, inicialmente para manter o oócito na prófase I da meiose e, após, por conduzir o sinal de LH, estimulando-o ao recomeço da meiose; além de ter importante papel metabólico e protetor durante a maturação citoplasmática.

É clara a importância das células somáticas durante o processo de maturação *in vivo*, e tem sido positiva também nos sistemas de cultivo para MIV em bovinos (SQUIRES, 1996). As células da granulosa são indispensáveis para o crescimento folicular, a diferenciação, o estágio nuclear meiótico, a maturação citoplasmática e a atividade transcricional genômica, uma vez que atingido um diâmetro limite, os oócitos suprimem a habilidade das células da granulosa em promover a continuidade do crescimento do folículo, e indiretamente, a do seu próprio crescimento (MATZUK et al., 2002).

Durante a maturação citoplasmática de oócitos bovinos maturados *in vitro*, as células do cumulus metabolizam glicose produzindo piruvato através do ciclo de Krebs, fornecendo piruvato ao oócito e, assim, melhorando sua qualidade. As células da granulosa reduzem cistina à cisteína e promovem a captação de cisteína, possibilitando o aumento dos níveis intercelulares de glutathione, e resultando em maiores taxas de fecundação normal e desenvolvimento embrionário até o estágio de blastocisto (TANGHE et al., 2002). Além disso, mantêm altos níveis de AMPc por difusão entre as células somáticas, cuja diminuição destes níveis após o pico de LH, causa a inativação da PKA e uma diminuição da fosforilação (inibitória a maturação) induzindo o retorno da meiose (CONTI et al., 1998).

2.2. Sistema de cultivo *in vitro*

2.2.1. Maturação *in vitro*

Segundo Hafez e Hafez (2000), a fêmea bovina possui por ocasião da puberdade, aproximadamente 70.000 oócitos em seus ovários, que pelas vias naturais, podem gerar perto de 0,01% de produtos viáveis, ou seja, um número próximo a dez descendentes em toda sua vida reprodutiva (BOLS et al., 1997). Tal índice reprodutivo levou à criação e difusão de inúmeras tecnologias na área de reprodução animal, dentre elas, a produção *in vitro* (PIV) na tentativa de obter o melhor aproveitamento do potencial reprodutivo da fêmea (SMITZ e CORTVRINDT, 2002).

A PIV é uma das biotécnicas mais difundidas e estudadas para a espécie bovina, pois possibilita contornar as perdas dos gametas femininos, determinadas pela dinâmica folicular (LEHMKUHL et al., 2002), e o aproveitamento de forma mais racional esses gametas (SENEDA et al., 2002).

Com todos os avanços da PIV, porém, seus índices tem permanecido estáveis, sendo a taxa de maturação nuclear e fecundação em torno de 80% e a de blastocisto entre 35-40% (PONTES et al., 2011), dentre os quais, cerca de 30% (PONTES et al., 2009) destes embriões são capazes de gerar uma prenhez após a transferência. Tais resultados mostram que quando os oócitos são maturados *in*

vivo, as taxas de blastocistos são superiores quando comparado às de oócitos maturados *in vitro*, sendo, portanto a maturação *in vitro* (MIV), um dos passos limitantes para o incremento na eficiência da PIV.

A MIV é a etapa inicial da PIV na qual oócitos são maturados na ausência de variados fatores originários do ovário e do organismo. A maturação *in vitro* envolve a remoção dos complexos cumulus-oócitos (CCOs) dos folículos antrais seguido do cultivo de células previamente selecionadas durante 24-48 horas, dependendo da espécie, até alcançarem a metáfase II. A eficiência dessa tecnologia é limitada por fatores intrínsecos do oócito, no que se refere ao estado bioquímico e molecular do oócito maturado em tornar-se potencialmente competente para a fertilização normal e para o desenvolvimento embrionário. Também há limitações na compreensão dos exatos constituintes oocitários relacionados à aquisição de sua competência, dentre eles, o papel que o ambiente folicular em torno do oócito exerce no progresso do desenvolvimento competente (GILCHRIST e THOMPSON, 2008). Portanto, cultivá-los em diferentes condições de cultivo para maturação *in vitro* que simulem o mais próximo possível o ambiente folicular, depende de descobrir quais constituintes foliculares participam do processo de aquisição da competência oocitária (inibindo ou estimulando), para assim otimizar os cultivos *in vitro*, e conseqüentemente o progresso do potencial do desenvolvimento embrionário.

2.2.2. Estresse oxidativo durante a MIV

Sabe-se que o metabolismo oxidativo é essencial para produção da energia celular que regula os processos fisiológicos, entretanto, está inevitavelmente associado à geração de espécies reativas de oxigênio (ERO) como resultado do metabolismo oxidativo durante a maturação *in vitro* (SILVA et al., 2011).

O metabolismo celular normal produz espécies reativas, os quais regulam diversas funções (DENNERY, 2007). Há relatos do envolvimento das ERO em concentrações fisiológicas na maturação oocitária (HAMMADEH et al., 2008), esteroidogênese folicular e luteal, ovulação, fertilização, implantação e desenvolvimento embrionário inicial (AGARWAL e ALLAMANENI, 2004; FUJII et al., 2005; MORADO et al., 2009). A primeira retomada da meiose é induzida por um

aumento de espécies reativas de oxigênio e inibida por agentes antioxidantes (TAKAMI et al., 2000), indicando que a geração desses radicais livres pelo folículo é um importante promotor da sequência ovulatória. No ovário, as ERO e espécies reativas de nitrogênio (ERN) são geradas dentro do microambiente folicular ao redor do oócito e das células somáticas, regulando a função ovariana através de vias de sinalização bioquímicas e moleculares (DEVINE et al., 2012).

No entanto, a produção cíclica dessas moléculas reativas pode, ao longo do tempo, afetar negativamente a progressão da metáfase II na segunda parada da meiose, pois estão associadas à inibição na produção de ATP e danos no DNA (BEHRMAN et al., 2001).

Em sistemas de cultivo *in vitro*, o estresse oxidativo ocorre quando o acúmulo de espécies reativas ao oxigênio ultrapassa a capacidade antioxidante do sistema, a partir da alta concentração de O₂ atmosférico que induz a geração de radicais livres produzidos por várias vias metabólicas e enzimas do oócito, embrião ou das células foliculares (células do cumulus) em cultivo (DIPLOCK ET AL., 1994).

O estresse oxidativo danifica os embriões ao causar peroxidação de fosfolipídios de membrana e alterar muitos tipos de moléculas celulares, tais como lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos, e as consequências incluem alterações mitocondriais, bloqueio de desenvolvimento, depleção do ATP (KOWALTOWSKI e VERCESI, 1999), apoptose e morte em vários tipos celulares (LIU et al., 2003), além das anomalias na fertilização e no desenvolvimento embrionários pré e pós implantação (NAVARRO et al., 2006).

Devido à produção de radicais livres ser um processo contínuo *in vivo*, as células desenvolveram mecanismos de defesa chamados de “sistema de defesa antioxidante” com o objetivo de neutralizar as espécies reativas de oxigênio e seus efeitos letais. Uma forma de minimizar os efeitos deletérios da formação de radicais livres durante o cultivo *in vitro* é a suplementação de antioxidantes nos meios de cultivo (SILVA et al., 2011).

2.2.3. Antioxidantes

Tendo em vista que o ambiente natural de oócitos e embriões é rico em agentes antioxidantes e quando cultivados *in vitro* são privados do sistema de defesa existente no fluido folicular e na tuba uterina (GARDINER e REED, 1995), a

adição de antioxidantes no meio de cultivo confere uma redução dos danos nas membranas celulares (ALVAREZ e MORAES, 2006), promovendo proteção aos oócitos e ou embriões submetidos ao estresse oxidativo.

A ação antioxidante que tem como função a remoção das espécies reativas pode ser desempenhada de duas maneiras: enzimática e não enzimática. Os antioxidantes enzimáticos mais eficientes envolvem a superóxido dismutase (SOD), a catalase e a glutathione peroxidase, enquanto os não enzimáticos são as vitaminas C e E, carotenóides, antioxidantes tióis, flavonóides naturais e melatonina entre outros.

2.3. Melatonina

2.3.1. Função Hormonal

A melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina) foi descoberta em 1958 por Lerner et al. Trata-se de uma indolamina derivada do aminoácido triptofano, produzida endogenamente em todos os organismos como bactérias (RODRIGUEZ-NARANJO et al, 2011), plantas (SETYANINGSIH et al., 2012), invertebrados (BAGNARES et al., 2012), mamíferos (HARDELAND e POEGGELER, 2003), com capacidade de desempenhar diversas ações fisiológicas devido às suas propriedades imunomodulatória e citoprotetora (CLAUSTRAT, 2005).

A melatonina é produzida principalmente na pineal e tem função hormonal relacionada ao controle da sazonalidade reprodutiva de algumas espécies animais (REITER et al, 2009). A maioria das espécies mamíferas usa a detecção de modificações no fotoperíodo para registrar mudanças estacionais, regulando o seu comportamento reprodutivo sazonal (fotoperiodismo) (ALEANDRI et al., 1996).

No entanto, nos últimos anos diversos estudos têm mostrado que a melatonina é sintetizada em outras partes do organismo como: retina, glândula lacrimal extra-orbitária, trato gastrointestinal, pele e ovário e que suas funções são mais variadas (TAMURA et al, 2009; HARDELAND et al., 1993; HUETHER, 1993; ITOH et al., 1999).

Os receptores para melatonina (MT1 e MT2) foram localizados em ovários de espécies não estacionais como murinos (SOARES et al, 2003), suínos (KANG et al, 2009) e humanos (NILES et al, 1999), sugerindo funções na reprodução além do controle da estacionalidade reprodutiva. A melatonina já foi detectada no fluido folicular de suínos (SHI et al, 2009) e humanos (NAKAMURA et al, 2003), e nesta espécie, em concentração mais elevada que no plasma (RÖNNBERG et al, 1990). Além disso, a concentração de melatonina variou em função do diâmetro folicular, mas de forma distinta de acordo com a espécie estudada. A concentração aumentou com o aumento do diâmetro folicular em humanos (NAKAMURA et al, 2003) e diminuiu em suínos (SHI et al, 2009). A origem da melatonina no fluido folicular parece ser a partir do plasma sanguíneo, embora as enzimas necessárias à sua síntese já tenham detectas em ovários de murinos (ITOH et al, 1997) e humanos (ITOH et al, 1999), indicando que o ovário teria capacidade de sintetizar a melatonina.

2.3.2. Síntese da Melatonina

Na glândula pineal, a via biossintética da melatonina inicia com a conversão do triptofano em 5-hidroxitriptofano por intermédio da ação da triptofano-5-hidroxilase (T-5-H), seguido da enzima 5-hidroxitriptofano descarboxilase (5-HTD) que catalisa a oxidação do 5-hidroxitriptofano em serotonina. Seqüencialmente, a serotonina é convertida em N-acetilserotonina através de uma reação de acetilação da enzima N-acetiltransferase (AANAT), produzindo N-acetil serotonina (NAS). Por fim, a enzima citosólica hidroxindol-O-metiltransferase, atualmente denominada acetilserotonina O-metiltransferase (ASMT) (REITER et al., 2009), catalisa a reação de metilação para a formação da melatonina (figura 4).

Figura 4. Biossíntese da melatonina. A síntese da hidroxitriptamina a partir do triptofano está estimulada pela luz, no entanto a atividade da enzima N-acetiltransferase (NAT) é estimulada pelo escuro (MAGANHIN et al., 2008).

2.3.3. Receptores da melatonina

A ação da melatonina nas células de espécies mamíferas pode ocorrer de quatro formas: através de sua ligação a proteínas intracelulares como a calmodulina; pelo “sequestro” de radicais livres, por ligação a receptores nucleares da família “orphan” e ligação a receptores de melatonina localizados na membrana plasmática (MACCHI e BRUCE, 2004). São descritos dois principais tipos de receptores de melatonina acoplados à membrana celular: MT1 e MT2, pertencentes à superfamília dos receptores ligados a proteína G (ROCHA et al., 2011).

O receptor MT1 está localizado no núcleo supraquiasmático, relógio biológico (DUBOCOVICH e MARKOWSKA, 2005), embora vários estudos tenham relatado sua presença também no ovário (YONEI et al., 2010) e nas células Leydig do testículo (FRUNGIERI et al., 2005). O receptor MT2 foi encontrado principalmente no cérebro, e também no miométrio, células da granulosa e testículos (DUBOCOVICH e MARKOWSKA, 2005).

Em particular, esses receptores ligam-se a proteína G_i e provocam uma redução sobre os níveis de AMPc, via inibição de adenilatosintase (enzima de síntese do AMPc) (TAMURA et al, 2009). O AMPc é um dos principais responsáveis pelo controle da maturação. A queda de seus níveis no oócito está relacionada à retomada da meiose e o conseqüente início da maturação. A queda do AMPc permite a ativação do fator promotor da maturação (MPF) e da proteína cinase ativada por mitógenos (MAPK), principais proteínas controladoras do ciclo celular (MOTLIK et al, 1998).

2.3.4. Ação antioxidante e antiapoptótica

Ilanas et al. (1991) foram os primeiros a sugerirem que a melatonina poderia funcionar como um antioxidante, visto sua atuação citoprotetora (antioxidante e antiapoptótica) contra os radicais livres. Sua natureza anfifílica (hidrofílica e hidrofóbica) a torna um antioxidante interessante para a pesquisa, uma vez que lhe permite atravessar facilmente a barreira morfofisiológica de todo organismo, protegendo as células do estresse oxidativo em ambos os ambientes celulares (lipídicos e aquosos) (REITER, 2000). Dentre as funções de melatonina pode-se citar que é um potente antioxidante, atuando tanto por via direta ao neutralizar espécies reativas de oxigênio ou nitrogênio (ROS e RNS, respectivamente), e como indireta via receptores de membrana estimulando enzimas antioxidantes (TAMURA et al, 2009), as quais atuarão na prevenção dos danos macromolaculares em todos os órgãos e porções celulares (HARDELAND et al., 2011).

Os mecanismos envolvidos na ação antioxidante da melatonina estão no fato de tratar-se de uma molécula altamente eletroreativa. Ela age primariamente como um poderoso doador de elétrons e detoxifica espécies reativas de oxigênio eletrodeficientes (VIJAYALAXMI et al., 2002). A atuação direta da melatonina

envolve a formação de metabólitos com excelente capacidade antioxidante, podendo ser em alguns casos até mesmo superiores a ela (GALANO et al, 2013). Os principais metabólitos da melatonina são 6-hidroximelatonina (6-HMEL), os quais são produzidos pelo citocromo p-450; N2-acetyl-N1-formyl-5-methoxykynuramine (AFMK), produzido por vários mecanismos enzimáticos e não enzimáticos; e N1-acetyl-5-methoxykynuramine (AMK) produzido pela deformação do AFMK. (COELHO, 2013).

Além deste mecanismo de ação, ela estimula as enzimas antioxidantes (TAMURA et al., 2008), e inibe as enzimas pró-oxidantes como as oxidases e lipoxigenases, possivelmente através de mecanismos epigenéticos (KORKMAZ et al., 2012). Em condições fisiológicas, a melatonina regula a expressão de genes de importantes enzimas antioxidantes, as quais estão envolvidas no metabolismo de derivados oxidativos prejudiciais às moléculas celulares, ou ainda induzem a síntese de outros antioxidantes endógenos como a glutathione peroxidase, a catalase, e a SOD (RODRIGUEZ et al., 2004). Tais eventos mantêm a estabilidade da membrana celular (GARCIA et al., 1997) promovendo a proteção do DNA mitocondrial e nuclear, dos ácidos graxos, e das proteínas contra os danos induzidos pela peroxidação lipídica (REITER et al 2000). Além de todos esses eventos, os quais impedem que as células sofram apoptose, a melatonina enquanto antiapoptótica, ainda é capaz de reparar com alta eficiência os danos da molécula de DNA causados pela radiação de íons ou exposição de drogas tóxicas (SLIWINSKA et al., 2007).

Estudos têm mostrado que a melatonina melhora os níveis intracelulares de glutathione por estimular a enzima limitante de sua biossíntese, γ -glutamylcysteine synthetase. Baydas et al. (2002) encontraram que uma deficiência de melatonina induzida por uma pinealectomia reduzia a atividade da glutathione peroxidase em vários tecidos de ratos. Em oócitos cultivados com H_2O_2 para induzir estresse oxidativo, a melatonina foi capaz de reverter a queda nas taxas de maturação causada pelo reagente (TAMURA et al, 2008).

Em ovinos, a melatonina (1 μ g/ml) melhorou a sobrevivência de embriões descongelados, aumentou a taxa de embriões eclodidos após 24 horas e reduziu o percentual de embriões degenerados ao final do cultivo *in vitro* (ABECIA et al., 2002). Em suínos, a suplementação do meio de maturação oocitária *in vitro* com melatonina (10 ng/ml) resultou em um maior percentual de oócitos em

metáfase II e uma porcentagem significativamente superior de blastocistos, embora sem efeitos sobre as taxas de clivagem e o número de células do blastocisto (KANG et al., 2009). Em caprinos, a suplementação *in vivo* com melatonina (3 mg) não afetou a maturação oocitária *in vitro*, entretanto promoveu uma taxa de clivagem (82,5%) e formação de blastocistos (31,5%) significativamente superior em comparação ao controle (BERLINGUER et al., 2009). Manjunatha et al. (2009) utilizaram 20 e 50 μ M de melatonina no meio de maturação de oócitos bubalinos e obtiveram maiores percentuais de maturação oocitária (90,3% e 88,8%, respectivamente) e produção embrionária (28,4 e 27,2%, respectivamente).

Também foi relatado seu papel antiapoptótico em células da granulosa atuando via receptor de membrana (NA et al, 2005), bem como alterando a expressão de genes relacionados à apoptose (CHOI et al, 2008). Há estudos também de seu envolvimento com a atividade de células da granulosa e da teca modulando a atividade esteroidogênica das mesmas, tendo induzido aumento de síntese de progesterona (WEBLEY e LUCK, 1986; WOO et al, 2001).

Diversos estudos mostram que a melatonina apresenta ação tanto na via extrínseca, ao modular a expressão dos receptores de morte, quanto na via intrínseca ao eliminar radicais oxidantes do citoplasma que podem ser gerados pela mitocôndria. De toda forma, há poucos estudos acerca do papel antiapoptótico da melatonina na espécie bovina.

2.3.5. Melatonina na maturação e cultivo *in vitro*

Devido aos crescentes dados relativos a outros papéis da melatonina, mais atenção tem sido dada à possibilidade de seu uso para melhorar a qualidade de oócitos. *In vivo*, observou-se que seu uso na forma de implantes vaginais em pequenos ruminantes promoveu a melhoria da qualidade dos oócitos, mesmo em animais em anestro (VALASI et al, 2006), com aumento na clivagem e produção de blastocistos (BERLINGUER et al, 2009). Em humanos, o tratamento oral com melatonina também melhorou a qualidade dos oócitos e conseqüentemente a taxa de fecundação e de gestação, principalmente por seu papel antioxidante (TAMURA et al, 2008).

Como a melatonina tem papel antioxidante, atua sobre células da granulosa e está presente no fluido folicular, alguns estudos também avaliaram seu

papel em condições de cultivo *in vitro*. Ela melhorou as condições de maturação oocitária ou apresentou um efeito positivo sobre embriões em várias espécies como camundongos (NA et al, 2005; TAMURA et al, 2009), ovinos (ABESCIA et al, 2002), suínos (CHOI et al, 2008; KANG et al, 2009) humanos (PARK et al, 2006) e búfalos (MANJUNATHA et al, 2009).

Em bovinos há poucos estudos, mas Papis et al (2007) observaram um efeito positivo no cultivo de embriões em condições de altas concentrações de O₂. Quando a melatonina foi adicionada ao meio de maturação dos oócitos Tsantarliotou et al (2007) não observaram nenhum efeito sobre a maturação nuclear ou o desenvolvimento embrionário, respectivamente. Takada et al (2010) também não observaram efeito da melatonina na MIV sobre a maturação ou desenvolvimento embrionário, porém relataram que o uso de melatonina sem a presença de gonadotropinas durante a MIV resultou em maturação e desenvolvimento similares ao observado ao uso apenas de gonadotrofina, sugerindo que a melatonina possa substituir os hormônios gonadotróficos na maturação. Todos esses estudos, porém, incluíram o soro fetal bovinos no meio de maturação, o que pode ter mascarado os efeitos da melatonina. De toda forma, há poucos estudos acerca do papel da melatonina na espécie bovina.

CAPÍTULO III
DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Experimento 1 : Efeito da melatonina sobre a maturação nuclear

Nesse experimento investigou-se o efeito da adição da melatonina sobre a maturação nuclear de oócitos bovinos submetidos à maturação *in vitro*. Os oócitos foram maturados na presença ou não de melatonina (10^{-9} e 10^{-6} M), FSH (controle positivo) e como controle adicional um grupo sem a adição de FSH ou melatonina. A maturação nuclear foi avaliada às 6, 12, 18 e 24 horas. Após a maturação, os oócitos foram processados conforme protocolo de coloração e avaliados da seguinte forma: oócitos submetido à MIV no período de 6 e 12 horas (% e VG ou MI) e 18 e 24 horas (% MII). Foram realizadas quatro repetições.

Experimento 2: Determinação do efeito da melatonina na abundância relativa de transcritos de genes antioxidantes em oócitos e células do cumulus

Nesse experimento buscou-se averiguar se a melatonina teria efeito sobre a expressão de genes de enzimas antioxidantes durante a maturação *in vitro* de oócitos bovinos. Para este experimento os oócitos foram maturados na presença ou não de melatonina (10^{-9} e 10^{-6} M), FSH (controle positivo) e como controle adicional um grupo sem a adição de FSH ou melatonina. Avaliou-se a abundância relativa de transcritos dos genes das enzimas antioxidantes: Cu,ZnSOD, MnSOD e GPx4, em oócitos e células do cumulus imaturos e maturados *in vitro* nos diferentes grupos experimentais pela técnica de PCR em Tempo Real. Foram realizadas três repetições.

Experimento 3: Determinação do efeito da melatonina sobre a proporção de células do cumulus apresentando apoptose (TUNEL).

Nesse experimento foi avaliado o efeito citoprotetor (antiapoptótico) da melatonina durante a maturação *in vitro* de oócitos bovinos sobre as células do

cumulus. Para este experimento os oócitos foram maturados na presença ou não de melatonina (10^{-9} e 10^{-6} M), FSH (controle positivo) e como controle adicional um grupo sem a adição de FSH ou melatonina. Após a maturação, as células do cumulus foram processadas de acordo com o protocolo de TUNEL e analisadas quanto à proporção de apoptose em cada grupo experimental por citometria de fluxo. Foram realizadas três repetições.

CAPÍTULO IV
MATERIAL E MÉTODOS

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Local do experimento

O experimento foi desenvolvido no Laboratório de Histologia do Departamento de Ciências Básicas da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo – Campus de Pirassununga. As análises de microscopia de fluorescência foram realizadas no Laboratório de Andrologia e Tecnologia de Embriões Suínos do Departamento da Veterinária em Reprodução Animal – VRA, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade de São Paulo - Campus de Pirassununga.

4.2 Coleta dos complexos cumulus-oócitos (CCOs)

Os complexos cumulus-oócitos (CCOs) foram obtidos a partir de ovários de vacas zebuínas ou mestiças, oriundos de frigoríficos localizados nos municípios de Ipuã e Sertãozinho (SP) e em São Sebastião do Paraíso (MG). Os ovários foram coletados logo após o abate dos animais e transportados em solução fisiológica estéril (NaCl 0,9%) à uma temperatura de 30°C. No laboratório, os ovários foram lavados com solução semelhante a do transporte. Os folículos ovarianos de 2-8 mm de diâmetro foram aspirados com agulhas de 18 G (1,20 X 40 mm) acoplada a uma seringa estéril de 10 mL (figura 5). O material aspirado foi depositado em tubos cônicos de 50 mL e permaneceu em repouso durante 15 minutos para decantação dos CCOs. A porção superior do líquido foi retirada e o sedimento foi recuperado e depositado em placas de Petri (60 x 15 mm) para a seleção e classificação dos CCOs sob estereomicroscópio. Foram utilizados nos experimentos somente oócitos com cumulus compacto com pelo menos 3-4 camadas de células e citoplasma uniforme (graus I e II), de acordo com os critérios adotados por De Loos (1989) (figura 5).

Figura 5. A) Aspiração de folículo ovariano bovino oriundo de abatedouro com seringa e agulha 18G. **B)** Oócitos com cumulus compacto com pelo menos 3- 4 camadas de células e citoplasma uniforme (graus I e II).

4.3 Maturação *in vitro*

Os CCOs selecionados foram lavados três vezes em meio H199 [(TCM 199 com 25 mM de Hepes acrescido de piruvato de sódio (0,25 mM) e gentamicina (25 µg/ml)]. Grupos de 20 a 30 CCOs foram maturados em microgotas de 100 µl de meio MIV [TCM 199 com 0,1% de álcool polivinílico (PVA), piruvato de sódio (0,25 mM) e gentamicina (25 µg/ml)] e cultivados sob óleo mineral em placas de Petri (10 x 35 mm). Para os experimentos, o meio de maturação foi suplementado com FSH 0,5 µg/ml (controle positivo) ou melatonina (10^{-9} e 10^{-6} M) e cultivados por até 24 h a 38,5°C em atmosfera de 5% CO₂ em ar e umidade saturada. Como controle adicional um grupo foi maturado sem a adição de FSH ou melatonina. No Anexo I encontra-se a descrição do preparo da melatonina para o cultivo.

4.4 Coloração para avaliação da taxa de maturação dos oócitos

4.4.1 Coloração com anti-lamina A/C e DAPI

Para determinação do estágio da meiose de forma a avaliar a taxa de maturação nuclear dos oócitos, foram utilizadas duas técnicas de coloração. Para avaliação de oócitos cultivados até 12h, cujo período é marcado pela maioria dos oócitos permanecerem em VG, utilizou-se a coloração anti-lamina A/C e DAPI, a qual marca a vesícula germinativa e cromatina, respectivamente. Os grupos de oócitos foram desnudados com PBS* [(solução salina fosfatada livre de Ca^{2+} e Mg^{+} acrescido de 0,1% de PVA (álcool polivinílico)] em vortex durante 3 minutos. Os oócitos desnudos foram fixados em solução de paraformaldeído 4% em PBS* por 24 h. Posteriormente, foram lavados três vezes em PBS* (5 minutos cada) e permeabilizados com Triton X-100 0,5% em PBS* (30 min) seguido da incubação em Tween 20 0,05% em PBS* (30min).

Em seguida, foram incubados na solução de bloqueio de PBS* com 2% de BSA (1h), e depois, com o anticorpo primário (anti-lamina A/C, 1:50, 1h). Foram lavados três vezes em PBS* e incubados com o anticorpo secundário (solução bloqueio contendo anti-IgG conjugado com FITC, 1:200) por 1 hora. Após mais 3 lavagens, os oócitos foram transferidos a uma microgota de 5 μL de Vectashield com DAPI sobre a lâmina, posteriormente montada com lamínula, para análise dos estádios da meiose em microscópio equipado com epifluorescência (Nikon, Modelo Eclipse NI-U), utilizando um filtro UV-2E/C (excitação 485nm para FITC e 350nm para DAPI). (PRENTICE-BIENSCH et al., 2012).

4.4.2 Coloração com Hoechst 33342

Para avaliação de oócitos cultivados no período de 18 a 24h, prosseguiu-se com a coloração de Hoechst, de forma a avaliar a progressão da maturação nuclear até MII. Os oócitos foram desnudados como já descrito e após fixação e permeabilização, foram corados com Hoechst (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) em 1 ml de PBS (15 min no escuro). Após isso, foram montados em lâmina e visualizados como já descrito.

4.4.3 Classificação do estágio da meiose dos oócitos

Para ambas as colorações, a classificação dos estádios de maturação nuclear foi avaliada segundo Hewitt e England (1997), baseada na morfologia do DNA, por diferentes graus de condensação dos cromossomos, conforme apresentado abaixo:

a. Vesícula germinativa (VG) – Presença do envelope nuclear e cromossomos apresentando-se pouco condensados (figura 6);

b. Metáfase I (MI) – Cromossomos com grau mais avançado de condensação começam a formar a placa equatorial (figura 7);

c. Metáfase II (MII) – cromossomos formando a placa equatorial e com 1º corpúsculo polar já exteriorizado (figura 7).

Figura 6. Fotomicrografia de oócito bovino em estágio de vesícula germinativa (VG). **A** e **C**. Cromatina descondensada, método de coloração DAPI; **B** e **D**. Presença de núcleo vesicular. Método de coloração Anti-lamina A/C. As setas apontam para a vesícula germinativa.

Figura 7. Fotomicrografia de oócito bovino nos estágios MI (**A** e **B**) e MII (**C** e **D**). **A.** Cromossomos com grau mais avançado de condensação; **B.** Cromossomos formando a placa equatorial; **C** e **D.** Grupos densos de cromossomos, formando o primeiro corpúsculo polar. Método de coloração Hoechst 33342. A seta aponta para a formação do primeiro corpúsculo polar.

4.5 PCR em tempo real de oócitos e células do cumulus

4.5.1 Congelamento e armazenamento dos oócitos e das células do cumulus para análise dos transcritos por PCR (reação em cadeia da polimerase)

Inicialmente os CCOs foram transferidos para gotas de 120 μ L de PBS* e pipetados por diversas vezes para isolamento das células do cumulus sem lisá-las. Os oócitos foram recuperados e o volume de PBS contendo as células do cumulus foi transferido a um microtubo e centrifugado a 12000 x g durante 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e ao pellet foi adicionado 1 U/ μ L de RNase

Out (Recombinant Ribonuclease Inhibitor, Invitrogen™, 40 U/μL Carlsbad, CA, EUA), seguido de imersão imediata em nitrogênio líquido e posteriormente armazenado a -80°C, até serem submetidas a extração de RNA. Os oócitos parcialmente desnudos foram transferidos para tubos de 5mL com 0,2 ml de PBS* e agitados em vórtex (3 minutos) seguido de três lavagens na mesma solução. A quarta lavagem foi realizada em solução de 1U/μL de inibidor de RNase, seguido da transferência dos oócitos ao microtubo e congelamento semelhante ao das células do cumulus.

4.5.2 Extração do RNA total de oócitos e células do cumulus pelo método de Trizol®

A amostra foi homogeneizada com 110 μL de solução contendo 100μL de TRIzol®, 1μL de acrilamida linear (Ambion®, 5mg/mL) e 9 μL de água DEPC e incubados por 5 minutos a temperatura ambiente. Após este procedimento, adicionou-se 20 μL de clorofórmio misturado por inversão, seguida de incubação a temperatura ambiente por 3 minutos. A amostra foi centrifugada a 12000 x g por 15 minutos a 4°C. O RNA foi removido da fase aquosa (70 μL), precipitado com 70 μL de álcool isopropílico seguido de uma incubação por 10 minutos a temperatura ambiente e 20 minutos a -20°C e centrifugação a 12000 x g por 10 minutos a 4°C. Removeu-se o sobrenadante e foi feita uma lavagem com etanol 75% (100 μL), seguido de uma centrifugação a 75000 x g por 5 minutos a 4°C. Após este procedimento, removeu-se o sobrenadante e realizou-se a eluição em 5 μL de água tratada com DEPC.

A quantificação do RNA total foi realizada no NanoDrop 2000 (Spectrophotometer- Thermo Scientific) medindo-se a densidade óptica entre os comprimentos de ondas: DO260/DO280_(nm). Prosseguiu-se somente com as amostras cuja razão variou entre 1,8 e 2,0, identificando a pureza da amostra.

4.5.3 Digestão com DNase I

O RNA extraído das amostras foi incubado a temperatura ambiente (25°C) durante 15 minutos com 1 μL 10X DNase I Reaction Buffer (1U/ μL), 1μL de

DNase I Amp Grade (1 U/ μ L), 0,25 μ L de inibidor de RNase, e 2,75 μ L de água DEPC para 5 μ L de RNA de oócitos. Para as células do cumulus, foi quantificada a amostra de RNA (ng/ μ L) no Nanodrop, seguido dos cálculos para a padronização de 1 μ g de todas as amostras de RNA extraídas e para o volume da água, cujo volume final foi de 10 μ L. Adicionou-se de 1 μ L de EDTA (25 mM) e prosseguiu-se com uma incubação de 70°C durante 10 minutos.

4.5.4 Transcrição reversa

Para a transcrição reversa (RT) em cDNA foi utilizado o kit “High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit” (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA) de acordo com as instruções do fabricante. A amostra digerida foi homogeneizada com um mix contendo 2 μ L de Buffer RT (10X), 0,8 μ L de dNTP (100 mM), 2,0 μ L de primer randômico (10X), 3,95 μ L de água DEPC, 1 μ L da enzima RT (50 U/ μ L) e 0,25 μ L de inibidor da RNase, incubada a 25°C por 10 minutos, aquecida a 37°C por 2 horas, seguida de 85 °C por 5 minutos, e resfriada a 4°C. Armazenou-se a amostra a -20 °C até o momento de uso.

4.5.5 PCR em tempo real

As amplificações foram realizadas em termociclador para PCR em tempo real (Applied Biosystems, 7500 Real Time PCR System). Nas reações para verificar a expressão dos genes alvo e dos endógenos (tabela 1), foi utilizado para cada gene, um mix contendo 10 μ L de Power SYBR Green® PCR Master Mix 1X (Applied Biosystems), 2 μ L de cada par dos oligonucleotídeos iniciadores (200nM) e 7 μ L de água ultra pura milliQ. Os genes alvo estudados foram Cu,ZnSOD, MnSOD, GPx4 e os genes endógenos β actina e GAPDH. As condições de termociclagem para os genes investigados estão descritos na tabela 1.

Tabela 1. Oligonucleotídeos iniciadores e condições de termociclagem dos genes relacionados à proteção celular (antioxidantes).

Genes	Condições de termociclagem
Cu,ZnSOD MnSOD GPx4 β actina GAPDH	Passo inicial a 50°C por 2 min, seguida de desnaturação a 95°C por 10 min e 45 ciclos de 95°C por 15 s e 60°C por 1 minuto. A curva de dissociação foi iniciada em 60°C com +0,1°C de incremento até atingir 95°C.

As sequências dos oligonucleotídeos iniciadores em estudo encontram-se na tabela 2. Cada amostra foi avaliada em duplicata para cada gene e toda reação de PCR conteve um controle negativo.

Tabela 2. Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores dos genes relacionados à proteção celular (antioxidantes).

Gene	Sequência (5' – 3')
<i>GAPDH</i>	GGCCTCCAAGGAGTAAGGTC AGGAGATTCTCAGTGTGGCG
β actina	GCAGGAGTACGATGAGTCCG TAACGCAGCTAACAGTCCGC
<i>Cu, ZnSOD</i>	ACACAAGGCTGTACCAAGTGC TGTCACATTGCCCAGGTCTC
<i>MnSOD</i>	TCCTGTTCAATCGCAGTTACAGA ACGGGGTGGTGACTATCAGA
<i>GPx4</i>	TGTGGTGAAGCGGTATGGTC CACGCCAGGTTCTCAGGTCT

4.5.6 Análise dos dados do PCR

Para a validação dos genes considerou-se dados da curva com 5 diluições seriadas (1:4) em oócitos e células do cumulus imaturos (figura 8).

O gene alvo e endógeno foram comparados por diferença de CT, prosseguindo com o *slope* da comparação entre os genes de valor inferior a 0,1, seguido da possibilidade dos genes comparados serem considerados de mesma eficiência (figura 9).

Figura 8. Curva padrão de amplificação para o gene Zn,CuSOD, por PCR em tempo real para células do cumulus em diluições seriadas de 1:4.

Para todos os genes, foi estabelecida a mesma linha de “threshold” no ponto médio da amplificação exponencial. As razões de expressão foram normalizadas pela razão de expressão dos controles endógenos (β actina e GAPDH). As diferenças nas freqüências dos transcritos dos genes foram calculadas pelo método comparativo do $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). Para isso, foi realizado primeiramente a média das duplicatas das amostras e a diferença entre a média dos Ct do gene alvo e gene endógeno (ΔCt). Após isso, fez-se a média dos ΔCt para o grupo controle (ΔCt médio) e foi feita a diferença entre ΔCt e ΔCt médio para cada amostra. E assim, finalizou-se com a seguinte fórmula: $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Após este cálculo, houve a normalização dos dados com a média do imaturo para cada gene estudado.

Figura 9. Em **A** e **B**: Cálculo da eficiência dos genes β actina e Zn,CuSOD baseado no *slope*. **C**: Diferença de CT dos dois genes em estudo para a validação da comparação relativa entre ambos.

4.6 Fragmentação nuclear em células do cumulus – TUNEL e citometria de fluxo

A técnica de TUNEL (do inglês, **T**erminal **d**eoxinucleotil **t**ransferase **U**racil **N**ick **E**nd **L**abeling) identifica *in situ* a fragmentação internucleossômica do DNA como indicativo de fragmentação nuclear (figura 10). Esta avaliação foi realizada com kit “In Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein” (Roche Diagnostics, Tokio), de acordo com as instruções do fabricante. Inicialmente os CCOs (grupos de 30 a 40) foram separados em controle positivo (Cont⁺), controle negativo (Cont⁻), amostras experimentais, e foram transferidos para gotas de 120 μ L de PBS* e pipetados por diversas vezes para o isolamento das células do cumulus. Após a

recuperação das células, o volume foi transferido para um microtubo e centrifugado a 1200 x g por 10 minutos a 4°C.

O sobrenadante foi descartado, o pellet foi ressuspensionado com 300 µL da solução fixadora de paraformaldeído 4% e mantido a 4°C durante 24 horas. As células do cumulus fixadas foram centrifugadas a 1200 x g por 10 minutos a 21°C, lavadas com 100 µL de PBS*, seguido de uma nova centrifugação com 100µL de PBS* (da mesma forma a todo passo realizado neste protocolo). Em seguida, as células foram permeabilizadas com 300 µL da solução 0,5% de Triton X-100 e 01% citrato de sódio em PBS* durante 1 hora a 4°C. Os pellets das células fixadas e permeabilizadas foram ressuspensionados em 100µL de PBS*, seguido de uma centrifugação apenas no grupo controle positivo, ao qual foram adicionados 50µL da solução DNase (5 µL de Tris-HCl , 6 µL de MgCl₂ 50 mM, 0,5 µL de DNase 1U/1µL e 38,5 µL de água ultra pura milliQ). Todos os grupos foram incubados a 37°C durante 1 hora, sendo o controle positivo em câmara úmida. Após lavagem, todas as amostras foram incubadas na solução TUNEL do kit. O grupo controle negativo foi ressuspensionado com 20 µL da solução marcadora (livre de enzima) e os demais grupos foram ressuspensionados em 20 µL do mix de reagentes do kit [(proporção de 10% de solução enzimática (enzima terminal deoxinucleotídeo transferase) e 90% de solução marcadora (conjugado fluorescente de dUTP)], seguido de incubação por 1 hora, no escuro, em câmara úmida a 37°C. O controle negativo foi incubado com solução marcadora na ausência da solução enzimática com o objetivo de conferir a marcação.

Posteriormente, todas as amostras foram lavadas e incubadas com 20 µL da solução Hoechst 33342 (concentração final 1µg/mL) por 10 minutos. Depois foram lavadas e eluídas em 100µL de PBS*, seguido de análise por citometria de fluxo (FACSAria, Beckton Dickinson Ltda) com o software FACSDiva v.6.2.1, (excitação 488nm para anexina e 375 nm para Hoechst). A cada rotina avaliada analisou-se primeiramente os grupos Cont⁺ e Cont⁻ (figura 11), seguido da análise dos grupos experimentais (no mínimo 10.000 células), sendo excluído da análise possíveis debris celulares. As células que apresentaram coloração azul (Hoechst 33342) indicaram a presença do núcleo e os núcleos fluorescentes em verde (FITC) indicaram apenas as células com fragmentação no DNA.

Figura 10. Esquema da técnica de TUNEL. Quando ocorre a quebra do DNA nas regiões internuclossomais ocasionado pela fragmentação nuclear, há exposição dos radicais 3'-OH. A enzima terminal desoxynucleotidyl transferase (TdT) catalisa a polimerização da extremidade 3', da união das caudas poli A com o conjugado fluorescente (FITC) e cauda poli- U, o qual sinalizará a fluorescência das quebras das fitas de DNA (Mesquita, L. 2010).

Figura 11. Análise em citometria de fluxo da frequência dos núcleos positivos (fragmentação no DNA) das células do cumulus marcadas pelo conjugado fluorescente FITC nos grupos: **A)** Cont⁺ tratado com a solução de DNase + solução enzimática (enzima terminal deoxinucleotídeo transferase) + solução

marcadora (conjugado fluorescente de dUTP; livre de enzima); **B)** Cont⁻ tratado apenas com solução marcadora.

4.7 Análise estatística

Os dados obtidos no experimento 1 foram submetidos ao teste Qui-quadrado (χ^2) e analisados através do programa estatístico GraphPad Prism. Os dados obtidos nos experimentos 2 e 3 foram analisados utilizando o programa estatístico Statistical Analysis System (SAS, 1995), com prévia verificação da normalidade dos resíduos pelo teste de Shapiro-Wilk (PROC UNIVARIATE). As variáveis que não atenderam às premissas estatísticas foram submetidas à transformação logarítmica [$\text{Log}(X+1)$]. Os dados originais ou transformados, quando necessário, foram submetidos à Análise de Variância (PROC ANOVA), e quando achada diferença significativa foi utilizado como pós-teste o teste de Tukey. Para ambas as análises o nível de significância considerado foi 5%.

CAPÍTULO V
RESULTADOS

5 RESULTADOS

5.1 Avaliação do efeito da melatonina na maturação nuclear

Nesse experimento avaliou-se a adição de diferentes concentrações de melatonina (10^{-9} e 10^{-6} M) em meio de maturação, visando determinar seu efeito sobre a capacidade dos oócitos em retornarem a meiose, rompendo a vesícula germinativa e avançando aos estádios posteriores da meiose após 6, 12, 18 e 24 h de cultivo *in vitro*.

Como esperado, a taxa de maturação avaliada às 6 h de MIV foi de 100% de oócitos em VG, não diferindo, portanto, entre os grupos ($P>0,05$), que nesse horário ainda não haviam retomado a meiose. Na tabela 3 são apresentadas as taxas de oócitos de todos os grupos experimentais que romperam a vesícula germinativa e atingiram a metáfase I (MI) no período de 12 horas.

Tabela 3. Estádio de maturação nuclear de oócitos maturados *in vitro* durante 12 h nos diferentes tratamentos.

Grupos experimentais	Total de oócitos	Oócitos em VG	Oócitos em MI
	Número (N)	N (%DP)	N (%DP)
Controle	65	31(46,0 $\pm$ 22,8) ^a	34 (54,0 $\pm$ 22,8) ^a
FSH	74	14 (19,3 $\pm$ 8,4) ^b	60 (80,7 $\pm$ 8,4) ^b
Mel 10^{-9} M	79	24 (29,1 $\pm$ 15,6) ^b	55 (70,8 $\pm$ 15,6) ^b
Mel 10^{-6} M	85	23 (28,5 $\pm$ 16,4) ^b	62 (71,5 $\pm$ 16,4) ^b

* Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças entre os grupos, $P<0,05$. Resultados correspondentes a três repetições realizadas.

Pode-se observar que o efeito da melatonina em ambas as concentrações avaliadas foi similar ao do FSH, diferindo do grupo sem adição de

hormônios ($P < 0,05$), sendo que a proporção de oócitos em metáfase I (MI) entre os grupos variou de 54 a 80,7 sendo mais baixa no grupo controle e mais alta no grupo suplementado com FSH.

Após 18 h de MIV (tabela 4), observou-se que a maioria dos oócitos já havia retomado a meiose atingindo o estágio de metáfase II (MII), sendo que apenas 4,72% dos oócitos avaliados permaneceram em VG. Observou-se que em ambos os estádios, a melatonina nas concentrações avaliadas teve efeito similar aos grupos controle e FSH ($P > 0,05$), sendo que a proporção de oócitos em MII entre os grupos variou de 57,2 a 74,2 sendo mais baixa no grupo tratado com melatonina na menor concentração e mais alta no grupo suplementado com FSH.

Tabela 4. Estádio de maturação nuclear de oócitos maturados *in vitro* durante 18 h nos diferentes tratamentos.

Grupos Experimentais	Total de oócitos	Oócitos em MI	Oócitos em MII
	Número (N)	N (%DP)	N (%DP)
Controle	59	20 (33,9 $\pm$ 14,6)	38 (64,7 $\pm$ 16,1)
FSH	75	18 (24,4 $\pm$ 5,2)	56 (74,2 $\pm$ 6,8)
Mel 10 ⁻⁹ M	61	19 (34,5 $\pm$ 20,9)	36 (57,2 $\pm$ 12,2)
Mel 10 ⁻⁶ M	67	23 (35,2 $\pm$ 15)	39 (58,0 $\pm$ 7,8)

* Não houve diferença significativa entre os tratamentos ($P > 0,05$). Resultados correspondentes a três repetições realizadas.

Após 24 h de MIV observou-se que a maioria dos oócitos atingiu o estágio de MII, sendo que a proporção de oócitos neste estágio variou entre 50,7 e 89,5, melatonina 10⁻⁹ M e FSH, respectivamente ($P < 0,05$) (Tabela 5). Os oócitos

em estágio de VG não estão descritos em forma de tabela e representam 11,1% dos oócitos avaliados.

Observou-se que o efeito da melatonina na maior concentração foi similar aos grupos controle e FSH, enquanto que na menor concentração se assemelhou apenas ao grupo sem adição de hormônios ($P>0,05$).

Tabela 5. Estádio de maturação nuclear de oócitos maturados *in vitro* durante 24 h nos diferentes tratamentos.

Grupos experimentais	Total de oócitos	Oócitos em MI	Oócitos em MII
	Número (N)	N (%DP)	N (%DP)
Controle	81	19(22,6±15,6) ^a	56 (69,3 ± 10,0) ^a
FSH	70	6 (8,6 ± 6,9) ^{bc}	63 (89,5 ± 7,6) ^{bc}
Mel 10 ⁻⁹ M	64	18 (29,4 ± 13) ^a	33 (50,7 ± 13,1) ^a
Mel 10 ⁻⁶ M	63	11(19,5 ± 8,8) ^{ac}	41 (66,6 ± 10,2) ^{ac}

* Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças entre os grupos, $P<0,05$. Resultados correspondentes a quatro repetições realizadas.

5.2 Determinação do efeito da melatonina na abundância relativa de transcritos de genes antioxidantes em oócitos e células do cumulus.

Para determinar o efeito da melatonina na expressão dos genes antioxidantes MnSOD, Cu,ZnSOD e GPx4, foram avaliados isoladamente oócitos e células do cumulus do mesmo pool de CCOs, considerando um grupo imaturo e os quatro grupos maturados *in vitro*: controle, FSH e melatonina (10⁻⁹ e 10⁻⁶ M) durante 24 horas. A quantidade relativa de transcritos de cada gene foi dada em relação ao grupo imaturo do respectivo gene.

Todos os genes antioxidantes foram expressos tanto em oócitos como em células do cumulus antes e após a maturação *in vitro*. Em células do cumulus observou-se uma maior expressão do MnSOD no grupo em que foi adicionado FSH ao meio de maturação ($P<0,05$) (figura 12). A melatonina nas diferentes

concentrações apresentou efeito similar ao da gonadotrofina ($P>0,05$). A menor concentração de melatonina apresentou efeito intermediário sendo similar ao grupo sem adição de hormônios ($P>0,05$).

Identificou-se uma maior expressão de CuSOD em cumulus de CCOs maturados com a maior concentração de melatonina (10^{-6} M, $P<0,05$), enquanto que a melatonina 10^{-9} M teve efeito similar ao FSH e ao grupo sem adição de hormônios e até mesmo ao grupo imaturo ($P>0,05$) (figura 13). Não foi encontrado diferença na expressão de GPx4 entre os grupos de células do cumulus (figura 14).

Não foi identificada diferença na expressão dos genes Cu,ZnSOD, MnSOD e GPx4 entre os grupos de oócitos antes e após a maturação *in vitro* ($P>0,05$) (figuras 12, 13, 14). A variação na expressão de alguns genes antioxidantes apenas nas células do cumulus sugere que estas estão envolvidas na proteção dos oócitos durante o processo de maturação contra o estresse oxidativo comumente gerado em sistemas *in vitro*.

Figura 12. Abundância relativa dos transcritos de MnSOD em oócitos e células do cumulus após maturação *in vitro* (24h) nos diferentes tratamentos.

* Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças entre os grupos, $P < 0,05$. Resultados correspondentes a três repetições realizadas.

Figura 13. Abundância relativa dos transcritos de Cu,ZnSOD em oócitos e células do cumulus após maturação *in vitro* (24h) nos diferentes tratamentos.

* Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças entre os grupos, $P < 0,05$. Resultados correspondentes a três repetições realizadas.

Figura 14. Abundância relativa dos transcritos de GPx4 em oócitos e células do cumulus após maturação *in vitro* (24h) nos diferentes tratamentos.

*Não houve diferença significativa entre os tratamentos ($P > 0,05$). Resultados correspondentes a três repetições realizadas.

5.3 Determinação do efeito da melatonina sobre a proporção de células do cumulus apresentando fragmentação nuclear (TUNEL).

Nesse experimento avaliou-se a adição de diferentes concentrações de melatonina (10^{-9} e 10^{-6} M) em oócitos bovinos maturados *in vitro* durante 24 horas, com o objetivo de verificar o efeito antiapoptótico deste hormônio pela determinação da proporção de células do cumulus que sofreram fragmentação nuclear. Para este estudo foram analisadas 10.000 células do cumulus, cujas médias dos núcleos positivos em cada grupo avaliado estão apresentados na tabela 6.

Observou-se que a média de núcleos positivos (com fragmentação nuclear) em todos os grupos variou muito pouco (33,4 a 41,5), sendo apenas numericamente mais baixa no grupo com maior concentração de melatonina e mais elevada no grupo controle (sem presença de hormônios), visto que não detectada diferença estatística de taxa de fragmentação nuclear entre os grupos ($P > 0,05$). Os resultados indicam que a melatonina, nas condições testadas não reduziu a quantidade de células do cumulus com fragmentação nuclear após 24 h de MIV.

Tabela 6. Proporção de fragmentação internucleossômica do DNA pela técnica de Tunel nas células do cumulus submetidas à maturação *in vitro* no período de 24 h.

Grupos experimentais	Média de núcleos positivos (%)	± DP
Controle	41,5	± 39,8
FSH	37,8	± 33,2
Mel 10^{-9} M	34,8	± 01,0
Mel 10^{-6} M	33,4	± 24,1

*Não houve diferença significativa entre os tratamentos ($P > 0,05$). Resultados correspondentes a três repetições realizadas.

CAPÍTULO VI
RESUMO DOS RESULTADOS

6 RESUMO DOS RESULTADOS

6.1 Quanto à cinética da maturação nuclear:

- A melatonina foi capaz de estimular a retomada da meiose de forma similar ao FSH (taxa de MI) no período de 12 e 18 horas, enquanto que a progressão do desenvolvimento do oócito até MII em 24 horas foi estimulada apenas pela melatonina em maior concentração.

6.2 Quanto à expressão gênica:

6.2.1 Células do cumulus

- A melatonina apresentou efeito citoprotetor (antioxidante) similar aos grupos FSH e controle na expressão de MnSOD, GPx4 e CuSOD, considerando seu efeito intermediário (na menor concentração) entre os grupos imaturo e Mel 10^{-6} M na expressão de MnSOD e CuSOD.

6.2.2 Oócitos

- A expressão dos genes MnSOD, CuSOD e GPX4 foi similar a todos os grupos (imaturo, presença e ausência de hormônios). A melatonina não teve efeito antioxidante relevante sobre os oócitos durante o cultivo *in vitro*.

6.3 Quanto à proporção de apoptose (Tunel):

- A melatonina não teve efeito citoprotetor (antiapoptótico) relevante sobre a proporção de células que sofreram fragmentação nuclear (Tunel) durante 24 horas de cultivo *in vitro*.

CAPÍTULO VII
DISCUSSÃO

7 DISCUSSÃO

Um dos principais fatores relacionado às baixas taxas de blastocistos obtidas pela técnica de PIV, é que nem todos os oócitos adquirem total competência para o desenvolvimento, uma vez que são removidos precocemente do ambiente folicular. Dessa forma, faz-se necessário desenvolver alternativas para o aprimoramento da técnica de MIV de forma a oferecer condições adequadas aos oócitos, tornando-os capazes de adquirirem a competência para serem fecundados e gerarem embriões viáveis. Diversos meios de cultivo e suplementações vêm sendo utilizados com o intuito de incrementar a qualidade da maturação dos oócitos cultivados *in vitro*. A adição de hormônios aos meios de maturação proporciona um ambiente mais apropriado e semelhante às condições *in vivo* (FERREIRA, 2010)

Neste contexto, considerando o papel citoprotetor (antioxidante e antiapoptótico) que a melatonina pode exercer, foi avaliado o efeito de sua suplementação no meio de cultivo sobre a maturação *in vitro* de oócitos bovinos e alguns parâmetros de proteção celular em oócitos e células do cumulus.

A melatonina, nas concentrações avaliadas, embora tenha sido capaz de induzir a expressão de alguns genes antioxidantes em células do cumulus, não provocou redução de fragmentação nuclear nas mesmas e também não teve efeito evidente de estímulo à maturação nuclear.

Em relação à maturação nuclear, há relatos contraditórios quanto à capacidade da melatonina em promovê-la. Nos poucos estudos em bovinos, a melatonina adicionada durante a MIV não apresentou efeito evidente sobre a maturação nuclear como relatado por Takada et al (2010), o que está de acordo com nossos resultados. Por outro lado, estudo de Farhavar et al (2010), observaram uma redução na proporção de oócitos atingindo o estágio de metáfase II após a MIV. Já no estudo de El-Raey et al (2011) a melatonina estimulou a maturação nuclear. Portanto, temos três estudos com três resultados diferentes (sem efeito, inibição e estímulo à maturação nuclear).

Em outras espécies o quadro é semelhante. Em suínos há relatos de efeitos positivos (KANG et al, 2009) ou ainda negativos ou sem efeito (NAKANO et al, 2011), sugerindo que a concentração utilizada tem influência importante nos

resultados. Em búfalos (MANJUNATHA et al, 2009) e camundongos (NA et al, 2005) há relatos de efeito estimulatório da melatonina sobre a maturação nuclear *in vitro*. Estudo em humanos também sugerem que o efeito é dependente da concentração, podendo estimular ou inibir a maturação (WEI et al, 2013).

No presente estudo foram testadas as concentrações de 10^{-9} e 10^{-6} M de melatonina. As avaliadas nos diferentes estudos são bastante variáveis de 10^{-3} até 10^{-13} M, além das variações na composição dos meios de cultivo, adição de outros aditivos como soro, fluido folicular, hormônios, etc. Tantas diferenças entre os estudos também dificultam a comparação. A maioria dos estudos incluiu no meio de maturação hormônios, além de soro ou fluido folicular, ambos sabidamente contém melatonina (COELHO et al, 2013). Em nosso estudo, utilizamos apenas melatonina para investigar o efeito dado apenas por este hormônio. Possivelmente seja necessária a combinação de melatonina com outros hormônios e/ou utilização de outras concentrações.

Além desses fatores, a utilização de sistema de cultivo em microgotas de meio cobertas com óleo mineral, também pode ter contribuído para não haver efeito do tratamento. A MIV é comumente realizada utilizando o meio coberto por óleo de parafina ou óleo mineral para evitar a evaporação (SHIMADA et al., 2001). No entanto o óleo pode absorver rapidamente os hormônios esteroides adicionados ao meio ou aqueles secretados pelas células do cumulus (GONÇALVES et al., 2008), podendo limitar a competência de desenvolvimento dos oócitos. A melatonina por se tratar de uma molécula anfifílica, portanto, com características hidrofílicas e hidrofóbicas, quando dissolvida em solução aquosa permanece estável e com atividade conservada por 12 dias, quando refrigerada a 4° C (SHIDA et al., 1994). Sabe-se que esta molécula é capaz de interagir com bicamadas lipídicas por interações hidrofóbicas, contudo, a exata determinação da interação desta molécula com o meio aquoso ou lipídico quando não disposto na forma de bicamada ainda não foi realizada.

O uso da melatonina em sistemas de produção *in vitro* (PIV) em gotas, microgotas ou mesmo em poços com sobrecamada de óleo mineral pode não ser o mais adequado, pois como molécula anfifílica, a melatonina se distribui de forma preferencial pela interface entre esses meios, não estando disponível às células em meio aquoso (NICOLAU, 2012).

El-Raey et al (2011) obteve efeitos bastante positivos da melatonina utilizada na maturação *in vitro*, utilizando meio sem soro (substituído por BSA), com FSH, mas sem óleo. Esses autores observaram aumento na taxa de maturação *in vitro*, com expansão do cumulus e distribuição mais uniforme das mitocôndria ao final da MIV. Takada et al (2010) também utilizaram óleo no cultivo, além de soro e hormônios e não observaram efeitos na maturação usando concentrações similares às utilizadas no presente estudo.

Por outro lado, vários trabalhos apontam efeitos positivos da melatonina em sistemas de cultivo *in vitro* usando meio suplementado com melatonina coberto pelo óleo mineral.

Papis et al (2007) ao cultivarem embriões bovinos em gotas de 100 µL de meio com melatonina na concentração 10^{-4} M, sob óleo mineral, obtiveram maior porcentagem de blastocistos. Sampaio et al (2012) usando cultivo sob óleo na MIV com concentrações até mais baixas de melatonina (10^{-12} M) observaram efeito positivo do hormônio sobre o desenvolvimento embrionário posterior. Casao et al (2010) observaram aumento nas taxas de oócitos maturados e de clivagens ao cultivar oócitos ovinos com 10^{-6} M de melatonina sob óleo mineral. Observação semelhante se deu em estudo com oócitos bubalinos (MANJUNATHA et al, 2009) usando 10^{-5} M de melatonina em meio com soro e FSH coberto com óleo.

Assim sendo, tais relatos sugerem que os sistemas de cultivo *in vitro* envolvendo meio de maturação e/ou cultivo acrescido de melatonina sob óleo mineral não necessariamente impedem o efeito da melatonina.

De toda forma, parece importante avaliar as mais diferentes condições de cultivo para melhor avaliar os efeitos da melatonina sobre as funções do oócitos e suas células do cumulus. Comparações do uso ou não de óleo, associação de soro e/ou hormônios, atmosfera gasosa, concentração utilizada, entre outros, devem ser considerados em estudos posteriores.

Assim sendo, em relação à maturação *in vitro* foi observado que em termos de estímulo à maturação, a melatonina em maior concentração promoveu a progressão meiótica de forma semelhante ao FSH, bem como seu estímulo na retomada da meiose por ambas concentrações, sugerindo que a retomada da meiose possa ser estimulada pela melatonina independente da concentração, mas a progressão até a conclusão do processo pela suplementação na maior concentração.

No entanto, a presença da melatonina em líquido folicular de folículos pré ovulatórios em humanos e a variação sazonal de seu conteúdo (BRZEZINSKI et al., 1987), assim como sua detecção em bovinos (COELHO et al, 2013), além da detecção de seus receptores em células ovarianas de ratos, camundongos, suínos (SOARES et al., 2003; NA et al., 2005) e também bovinos (EL-RAEY et al, 2011), sugere que este hormônio tenha efeito direto sobre a maturação e a competência oocitária, merecendo novos estudos sobre o tema.

Dentre as várias funções relatadas em relação à melatonina, uma das mais importantes é seu papel no combate ao estresse oxidativo, via direta ou indireta atuando sobre a expressão e atividade de enzimas antioxidantes. Na avaliação do efeito da melatonina sobre a expressão de enzimas antioxidantes (Cu,ZnSOD e MnSOD e GPx4) em oócitos e células do cumulus, observou-se efeito apenas sobre as células (Cu,ZnSOD e MnSOD).

Embora não haja relatos do efeito da melatonina na expressão dessas enzimas antioxidantes em oócitos e células do cumulus, essa função já é conhecida em outras células (TAMURA et al., 2009). Em embriões murinos cultivados com melatonina, houve aumento na expressão de SOD e Bcl2, redução para Bax e não houve efeito para GPx (WEI et al, 2013). A melatonina também foi capaz de reduzir a expressão do gene pró-apoptótico Bax em embriões suínos cultivados *in vitro* (CHOI et al, 2008) o que estaria relacionado à redução na apoptose observada nesses embriões. Por outro lado, Rodriguez-Osorio et (2007) não observaram esse mesmo efeito. Essas diferenças são provavelmente relacionadas às diferenças nas condições de cultivo de cada estudo, o que, como mencionado anteriormente, tem influência importante sobre os efeitos da melatonina observados *in vitro*.

De todo modo, os resultados trazem indícios de que em células do cumulus bovinas, a melatonina tenha capacidade de afetar a expressão de genes de enzimas antioxidantes para proteger os CCOs do estresse oxidativo do cultivo *in vitro*.

Para a maturação células do cumulus e oócitos requerem energia, esta por sua vez é encontrada principalmente na forma de ATP e NADPH, sendo ambos produzidos através da cadeia transportadora de elétrons situada nas mitocôndrias. Espécies reativas de oxigênio (ROS) são geradas como subproduto deste sistema

de produção de energia. Uma vez que os níveis intracelulares de ROS são regulados pelo balanço entre enzimas antioxidantes e enzimas pró-oxidantes, qualquer alteração fisiológica pode acarretar em uma produção excessiva de ROS, o que causa danos ao DNA, indução da apoptose e peroxidação lipídica (Takahashi, 2012).

Estratégias para o desenvolvimento de um sistema de cultivo que diminua o estresse oxidativo e aumente a eficiência da MIV podem ser alcançadas através da melhor compreensão dos eventos moleculares que levam a maturação dos oócitos, de modo que estes eventos possam ser reproduzidos *in vitro*. Nesse sentido, a adição de antioxidantes exógenos ao meio de maturação têm sido foco de diversos estudos devido à importância de fatores produzidos pelo oócito ou pelas células somáticas envolvidos na proteção do oócito durante o seu cultivo fora do folículo ovariano. Vários trabalhos relatam o efeito antioxidante da melatonina e a atuação do FSH sobre o desenvolvimento do oócito, fecundação e desenvolvimento embrionário no ambiente de estresse oxidativo. El-Raey et al (2011) relataram que a melatonina tem capacidade de reduzir a geração de ERO em oócitos bovinos e que os complexos cumulus-oócitos potencialmente teriam capacidade de produzir melatonina. Além disso, a presença de melatonina também no fluido folicular bovino (COELHO et al, 2013) reforça a hipótese de que ela desempenhe funções importantes no ovário bovino.

A ação indireta da melatonina como antioxidante é dada por sua capacidade em estimular enzimas antioxidantes e inibir enzimas pro-oxidantes como os oxidases, NADPH e lipoxigenases (RODRIGUEZ et al., 2004) possivelmente através de mecanismos epigenéticos (KORKMAZ et al., 2012). A melatonina, em concentrações fisiológicas no soro sanguíneo induz a expressão das três principais enzimas antioxidantes Cu,ZnSOD, MnSOD e GPx (TAMURA et al., 2009), e aumenta a atividade de SOD, reduzindo significativamente os danos oxidativos intrafoliculares, consequentemente alcançando o aumento das taxas fertilização e prenhez (TAMURA et al., 2012; REITER et al., 2013). Ainda, quando administrada via intravenosa tem-se um aumento no RNAm para ambas as enzimas SOD e taxas elevadas da atividade do GPx.

Apesar do efeito da melatonina em estimular um aumento na expressão de enzimas antioxidantes em células do cumulus, tal fato não se traduziu em redução no número de células com fragmentação nuclear. A adição de melatonina

no meio de maturação não teve efeito sobre a diminuição da fragmentação nuclear nas células do cumulus, sendo similar ao grupo tratado com FSH e o grupo sem adição de hormônios. A apoptose é caracterizada por uma série de eventos bioquímicos e morfológicos observados no núcleo e no citoplasma das células que entram nesse processo. A condensação e fragmentação do DNA nuclear estão comumente associadas à quebra do DNA nuclear em fragmentos de 200 pares de base. O citoplasma se torna denso e com corpos apoptóticos e vesícula, podendo ainda ser observado a peroxidação lipídica e oxidação de proteínas (HALL, 1999). A apoptose pode ser confirmada *in situ* por meio do ensaio TUNEL, em que a enzima terminal “desoxynucleotidyl transferase” (TdT) catalisa a incorporação de “biotinylated deoxyuridine” (dUTP) nos locais de quebra de DNA, em que o sinal é amplificado por fluorescência. A reação preferencialmente detecta células que iniciaram o processo de morte celular (NEUBER et al., 2002).

Estudos anteriores já constatarem a capacidade anti-apoptótica da melatonina em sistemas de produção *in vitro* em diversas espécies, como por exemplo, em suínos (CHOI et al., 2008) e camundongos (WANG et al., 2013). Na et al (2005) ao avaliarem o efeito da melatonina a 1 μM (10^{-6} M) em CCOs de camundongos cultivados *in vitro*, observaram uma diminuição da apoptose. Choi et al. (2008) verificaram que a melatonina promoveu uma diminuição significativa da taxa de núcleos apoptóticos em embriões suínos partenogenéticos. Ao contrário, Takada et al. (2010) ao avaliarem o efeito da melatonina na maturação de oócitos bovinos, não observaram efeito da mesma na apoptose dos embriões produzidos, utilizando outra técnica de avaliação (ensaio cometa). Por outro lado, Nakano et al (2011) relataram que observaram redução na produção de ERO, mas que tal observação não correlacionou com redução na fragmentação nuclear dos embriões resultantes, similar ao nosso estudo, em que o aumento de expressão de enzimas antioxidantes não resultaram em redução da fragmentação nuclear em células do cumulus. Domingues et al (2013) ao estudar o efeito da suplementação de melatonina nanoencapsulada em diferentes concentrações (10^{-12} , 10^{-9} e 10^{-6} M) sobre a taxa de apoptose em embriões bovinos produzidos *in vitro*, verificou efeito positivo da melatonina nanoencapsulada comparada à melatonina livre, comumente usada nos meios tradicionais de cultivo. O grupo de blastocistos que recebeu a suplementação de melatonina nanoencapsulada, além de apresentar um maior número de células, exibiu uma diminuição na taxa de células apoptóticas em

relação ao grupo com melatonina livre. A principal limitação do uso de melatonina está baseada em sua meia-vida biológica curta (HARDELAND et al., 2006). Para promover o efeito anti-apoptótico da melatonina, o uso da nanotecnologia pode ser uma ferramenta adicional para o desenvolvimento de novos produtos capazes de potencializar seu efeito biológico e de melhorar os sistemas de produção *in vitro* de embriões (DOMINGUES et al., 2013). Assim sendo, embora não tenhamos observado redução na fragmentação nuclear, observamos aumento na expressão de enzimas antioxidantes, indicando que é bastante provável que ação anti-apoptótica também ocorra desde que se estabeleça as melhores condições de cultivo *in vitro* para que a melatonina seja capaz de exercer seus efeitos de modo adequado.

No presente trabalho, as propriedades antiapoptóticas da melatonina não foram evidenciadas, embora discretos efeitos potencialmente antioxidantes (expressão de enzimas) tenham sido observados. A maturação nuclear nas condições estudadas também não foi estimulada evidentemente pela melatonina. Contudo, a melatonina ainda pode ser uma importante ferramenta na melhoria da produção *in vitro* na espécie bovina, ressaltando a importância de se investigar um melhor sistema de cultivo para a utilização de melatonina, no que diz respeito a sua concentração, presença ou ausência de óleo mineral, associada ou não às gonadotrofinas (FSH e ou LH), soro entre outros aditivos.

CAPITULO VIII
CONCLUSÕES

8 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos no presente estudo pode-se concluir que, nas condições testadas:

- a melatonina pode estimular a retomada da meiose de oócitos de forma similar ao FSH, bem como promover a progressão da meiose até a metáfase II pela sua maior concentração;
- a melatonina é capaz de induzir a expressão de genes de enzimas antioxidantes de forma similar ao FSH (CuZnSOD, MnSOD e GPx4) em células do cumulus bovinas;
- a expressão de enzimas antioxidantes não é afetada pela melatonina em oócitos;
- a melatonina não reduz a frequência de fragmentação nuclear em células do cumulus após a maturação *in vitro*.

Assim sendo, a melatonina nas concentrações avaliadas (10^{-9} e 10^{-6} M), embora seja capaz de estimular a maturação nuclear e induzir a expressão de alguns genes antioxidantes em células do cumulus bovinas, ainda que de forma semelhante ao FSH, não provocou redução da fragmentação nuclear nestas células.

ANEXO

ANEXO

Preparo da solução da melatonina

A solução primária da melatonina bem como a sua diluição seriada, utilizada nos grupos experimentais, foram preparadas no dia do experimento. Para cada rotina utilizou-se 10 mL de meio MIV.

- a. **Solução primária (melatonina 10^{-2} M):** Diluiu-se 0,0023 g de melatonina inicialmente em 40 μ L de etanol 100%, seguida da homogeneização em vórtex durante 3 minutos. Posteriormente, foram adicionados 960 μ L de meio MIV, seguido de uma nova homogeneização pelo vórtex durante 1 minuto.
- b. **Solução intermediária (melatonina 10^{-3} M):** Pipetou-se 100 μ L da solução de melatonina 10^{-2} M e completou-se a solução com meio MIV para um volume final de 1 mL. Homogeneizou-se a solução no vortex durante 1 minuto.
- c. **Solução de uso (melatonina 10^{-6} M):** Pipetou-se 1 μ L da solução de melatonina 10^{-3} M e completou-se a solução com meio MIV para o volume final de 1 mL, seguido da homogeneização da solução.
- d. **Solução de uso (melatonina 10^{-9} M):** Pipetou-se 1 μ L da solução de melatonina 10^{-6} M e completou-se a solução com meio MIV para o volume final de 1 mL, seguido da homogeneização da solução.

CAPÍTULO IX
REFERÊNCIAS

9. REFERÊNCIAS

ABECIA, J.A.; FORCADA, F.; ZÚÑIGA, O. The effect of melatonin on the secretion of progesterone in sheep and on the development of ovine embryos *in vitro*. **Veterinary Research Communications**, v.26, p.151-158, 2002.

AGARWAL, A.; ALLAMANENI, S.S.R. Role of free radicals in female reproductive diseases and assisted reproduction. **Reprod Biomed Online**, v.9, p.338-347, 2004.

ALEANDRI, V.; SPINA, V.; MORINI, A. The pineal gland and reproduction. **Human Reproduction**, v. 2, p. 225–235, 1996.

ALVAREZ, C.A.; MORAES, G.V.; Efeitos da selenometionina e vitamina C sobre o sêmen. **SaBios: Rev Saúde Biol**, v.1, p.42-51, 2006.

ANGUITA, B.; JIMENEZ-MACEDO, A.R.; IZQUIERDO, D.; MOGAS, T.; PARAMIO, M.T.; Effect of oocyte diameter on meiotic competence, embryo development, p34 (cdc2) expression and MPF activity in prepuberal goat oocytes. **Theriogenology**, v.67, p.526-536, 2007.

BAGNARESI, P.; NAKABASHI, M.; THOMAS, A.P.; REITER, R.J.; GARCIA, C.R.S. Mol. Biochem. Parasitol., 181(1), p.1–6, 2012.

BAKER, J.M.B.; GODINHO, H.M.; CARVALHO, E.S.; MARTINS, M.A.B. Fecundidade e local de desova de *Pimelodus maculatus*. **Ciênc. Cult.**, v.24, p.345, 1972.

BAYDAS, G., GURSU, M.F., YILMAZ, S., CANPOLAT, S., YASAR, A., CIKIM, G.; CANATAN, H. Daily rhythm of glutathione peroxidase activity, lipid peroxidation and glutathione levels in tissues of pinealectomized rats. **Neuroscience Letters**, 323 (3), p.195–198, 2002.

BEHRMAN, H.R.; KODAMAN, P.H.; PRESTON, S.L.; GAO, S. Oxidative stress and the ovary. **J Soc Gynecol Investig**, v.8, p.40-42, 2001.

BERLINGUER, F.; LEONI, G.G.; SUCCU, S.; SPEZZIGU, A.; MADEDDU, M.; SATTA, V.; BEBBERE, D.; CONTRERAS-SOLIS, I.; GONZALEZ-BULNES, A.; NAITANA, S. Exogenous melatonin positively influences follicular dynamics, oocyte developmental competence and blastocyst output in a goat model. **Journal of Pineal Research**, v.46, p.383–391, 2009.

BLODIN, P.; SIRARD, M.A. Oocyte and follicular morphology as determining characteristics for developmental competence in bovine oocytes. **Mol. Reprod. Dev.**, New York, v.41 (1), p.54-62, 1995.

BRZEZINSKI, A.; SEIBEL, M.M.; LYNCH, H.J.; DENG, M.H.; WURTMAN R.J. Melatonin in human preovulatory follicular fluid. **J Clin Endocrinol Metab**, v.64, p.865-867. 1987.

BREVINI-GANDOLFI, T.A.; CILLO, S.; MODINE, S.; GANDOLFI, F. Deffective developmental capacity of bovine oocytes is accompanied by a shorter poly(A) tail of maternal transcripts. **J Reprod Fertil Abstr Ser**, v.19, p.41-42, 1997.

BREVINI-GANDOLFI, T.A.; GANDOLFI, F. The maternal legacy to the embryo: cytoplasmic components and their effects on early development. **Theriogenology**, v.55, p.1255-1276, 2001.

BOLS, P.E.J.; YSEBAETI, M.T.; VAN SOOM, A.; KRUIF, A. Effects of needle tip bevel and aspiration procedure on the morphology and developmental capacity bovine compact cumulus oocyte complexes. **Theriogenology**, v. 47, p. 1221-1236, 1997.

BURKHARDT, S.; REITER, R.J.; TAN, D.X.; HARDELAND, R.; CABRERA, J.; KARBOWNIK, M. DNA oxidatively damaged by chromium (III) and H₂O₂. Is protect by the antioxidants melatonin, N(1)-acetyl-N (2)-formyl-5-methoxykynuramine, Resveratrol and uric acid. Int. **J. Biochem Cell Bio**. 2001, v.33 (8), p. 775-83.

CASAO, A.; ABECIA, J.A.;CEBRIAN-PÉREZ, MUIÑO-BLANCO, T.; VÁZQUEZ, M.I.; FORCADA, F. The effects of melatonina on *in vitro* oocyte competence and embryo development in sheep. **Spanish Journal of Agricultural Research**, v.8 (1), p. 35-41, 2010.

CHOI, J.; PARK, S.M.; LEE, E.; KIM, J.H.; JEONG, Y.I.; LEE, J.Y.; PARK, S.W.; KIM, H.S.; HOSSEIN, M.S.; WOO, J.Y.W.; KIM, S.; HYUN, S.H.; HWANG, W.S. Anti-apoptotic effect of melatonin on preimplantation development of porcine parthenogenetic embryos. **Molecular Reproduction and Development**, v.75, p.1127-1135, 2008.

CLAUSTRAT, B.; BRUN, J.; CHAZOT, G. The basic physiology and pathophysiology of melatonin. **Sleep Medicine Reviews**, v. 9 (1), p. 11-24, 2005.

COELHO, M.B.; RODRIGUES-CUNHA; M.C., FERREIRA, C. R.; CABRAL, E. C.; NOGUEIRA, G. P.; EBERLIN, M.N.; LEAL, C.L.V.; SIMAS, R.C. Assessing melatonin and its oxidative metabolites amounts in biological fluid and culture medium by liquid

chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry (LC-ESI-MS/MS) . **Anal. Methods** - DOI: 10.1039/c3ay41315b, 2013.

CONTI, M.; ANDERSEN, C.B.; RICHARD, F.J.; SHITSUKAWA, K.; TSAFRIRI, A. Role of cyclic nucleotide phosphodiesterases in resumption of meiosis. **Mol Cell Endocrinol**, v.145, p.9-14, 1998.

DENNERY, P.A. Effects of oxidative stress on embryonic development. **Birth Defects Res. C: Embryo**, v. 81, p. 155–162, 2007.

DE LOOS, F.; KASTROF, P.; VAN BENEDEN, T.H.; KRUIPT, T.A. Heterologous cell contacts and metabolic coupling in bovine cumulus oocyte complexes. **Mol Reprod Dev**, v.28, p.255-259, 1991.

DEVINE, P.J.; PEREEAULT, S.D.; LUDERER, U. Roles of reactive oxygen species and antioxidants in ovarian toxicity. **Biol Reprod**, v.86 (2), p. 1-10. 2012.

DIELEMAN, S.J.; ET AL. Effects of in vivo prematuration and *in vivo* final maturation on developmental capacity and quality of pre-implantation embryos. **Theriogenology**, Gainesville, v.57, p. 5-20, 2002.

DIPLOCK, A.T. Antioxidants and free radicals scavengers. In: Rice-Evans CA, Burdon RH (Ed.). Free radical damage and its control. Amsterdam: **Elsevier**, p.113-115.1994.

DOMINGUES, W. B.; KOMNINO, E.R.; REMIÃO, M.H.; LUCAS, C.G.; CAMPOS, V.F.; COLLARES, T. Efeito da suplementação de melatonina nanoencapsulada sobre a taxa de apoptose em embriões bovinos produzidos *in vitro*. In: XXII Congresso de Iniciação Científica da Universidade Federal de Pelotas, Universidade federal de Pelotas, 2013.

DRIANCOURT, M.A. Follicular dynamics in sheep and cattle. **Theriogenology**, v.35, p.55-68, 1991.

DUBOCOVICH, M.L.; MARKOWSKA, M. Functional MT1 and MT2 Melatonin Receptors in Mammals. **Endocrine**, v.27, p.101–110, 2005.

EL-RAEY, M.; GESHI, M.; SOMFAI, T.; KANEDA, M.; HIRAKO, M.; ABDEL-GHAFFAR, A.E.; SOSA, G.A.; EL-ROOS, M.E.; NAGAI, T. Evidence of melatonin synthesis in the cumulus oocyte complexes and its role in enhancing oocyte maturation *in vitro* in cattle. **Mol. Reprod. Dev**, v.78, p.250-62, 2011.

EMANUELLI, I. P. Interação cumulus e oócitos no processo de morte celular programada durante a produção de embriões bovinos *in vitro*. 2005. 93f. Dissertação de Mestrado em Zootecnia (Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos). Universidade de São Paulo- Pirassununga.

EPPIG, J.J.; SCHROEDER, A.C. Capacity of mouse oocytes from preantral follicles to undergo embryogenesis and development to live young after growth, maturation and fertilization in vitro. **Biol Reprod**, v.41, p.268-276, 1989.

EPPIG, J.J.; Intercommunication between mammalian oocytes and companion somatic cells. **Bioessays**, Cambridge, v.13 (1), p.569-574, 1991.

EPPIG, J.J. Further reflections on culture systems for the growth of oocytes *in vitro*. **Hum Reprod**, v.9, p.974-976, 1994.

ERICKSON, B.H. Development and senescence of the post natal bovine ovary. **J Anim Sci**, v.25, p.800-805, 1966.

FAIR, T.; HYTTEL, P.; GREVE, T. Bovine oocyte diameter in relation to maturational competence and transcriptional activity. **Mol Reprod Dev**, v.42, p.437-442, 1995.

FAIR, T.; HULSHOF, S.C.J.; HYTTEL, P.; BOLAND, M.; GREVE, T. Bovine oocyte ultrastructure in primordial to tertiary follicles. **Anat Embryol**, v.195, p.327-336, 1997.

FARAHAVAR, A.; SHAHNE, A.Z.; KOHRAM, H.; VAHEDI, V. Effect of melatonin on *in vitro* maturation of bovine oocytes. **African Journal of Biotechnology**, v.9 (17), p. 2579-2583, 2010.

FERREIRA, E.M.; VIREQUE, A.A.; ADONA, P.R.; MEIRELLES, F.V.; FERRIANI, R.A.; NAVARRO, P.A.A.S. Cytoplasmic maturation of bovine oocytes: structural and biochemical modifications and acquisition of developmental competence. **Theriogenology**, v.71, p.836-848, 2009.

FERREIRA, M.A. Maturação nuclear e citoplasmática de oócitos de cadelas colhidas em diferentes fases do ciclo estral e cultivados in vitro em meios sequenciais com hormônios e espermatozoides. 2010. 95f (Dissertação de Mestrado em Reprodução animal)- Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias . Universidade Estadual Paulista "Julio Mesquita Filho". Jaboticabal.

FRANDSON, R. D. Anatomy and physiology of farm animals. 3rh ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 553p. 1981.

FRUNGIERI, M.B.; MAYERHOFER, A.; ZITTA, K.; PIGNATARO, O.P.; CALANDRA, R.S.; GONZALEZ-CALVAR, S.I. Direct effect of melatonin on syrian hamster testes: melatonin subtype 1a receptors, inhibition of androgen production, and interaction with the local corticotropin-releasing hormone system. **Endocrinology**, v.146, p.1541–1552, 2005.

FUJII, J.; IUCHI, Y.; OKADA, F. Fundamental roles of reactive oxygen species and protective mechanisms in the female reproductive system. **Reprod Biol Endocrinol**, v.3, p.43, 2005.

GALANO, A.; TAN, D.X.; REITER, R.J. On the free radical scavenging activities of melatonin's metabolites, AFMK and AMK. **J. Pineal Res**, v.54, p.245-257, 2013.

GARCIA, J.J.; REITER, R.J.; GUERRERO, J.M.; ESCAMES, G.; YU, B.P.; OH, C.S.; MUÑOZ- HOYOS, H. Melatonin prevents changes in microsomal membrane fluidity during induced lipid peroxidation. **FEBS Lett**, v. 408, p.297-300. 1997.

Gardiner, C.S.; Reed, D.J. Synthesis of glutathione in the preimplantation mouse embryo. **Arch Biochem Biophys**, v.318, p.30-36, 1995.

Gilchrist, R.B.; Lane, M.; Thompson, J.G. Oocyte-secreted factors: regulators of *cumulus* cell function and oocyte quality. **Hum Reprod Update**, v.14, p.159-177, 2008.

GONÇALVES, P.B.D.; OLIVEIRA, M.A.L.; MEZZALIRA, A.; MONTAGNER, M.M.; VISITIN, J.A.; COSTA, L.F.S.; Produção *in vitro* de embriões. In: Biotécnicas aplicadas à reprodução animal. 2.ed. São Paulo: Roca, 2008. p.261-291.

GORDON, I. Laboratory production of cattle embryos. 1 ed. Cambridge: University Press, p.639,1994.

GRUPEN, C.G. The evolution of porcine embryo in vitro production. **Theriogenology**, v.81, p. 24-37, 2013.

HAFEZ, E.S.E.; HAFEZ, B. Reproduction in farm animals. 7. Ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 509p, 2000.

HAFEZ, E.S.E.; HAFEZ, B. Reprodução animal. 7.ed. São Paulo: Manole, 513p, 2004.

HALL, A.G.; The role of glutathione in the regulation of apoptosis . **European Journal of Clinical Investigation**, v. 29, p.238-245, 1999.

HAMMADEH, N.; COOMARASAMY, A.; OLA, B.; PAPAIOANNOU, S.; AFNAN, M.; SHARIF, K. Ultrasound-guided hydrosalpinx aspiration during oocyte collection improves outcome in IVF: a randomized controlled trial. **Hum Reprod**, v.23, p.1113-1117, 2008.

HARDELAND, R.; REITER, R.J.; POEGGELER, B.; TAN, D.X. The significance of the metabolism of the neurohormone melatonin: antioxidative protection and formation of bioactive substances. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 17, p. 347–357, 1993.

HARDELAND, R.R. *et al.* Melatonin - a pleiotropic, orchestrating regulator molecule. **Progress in Neurobiology**, v. 93 (3), p. 350-84, mar. 2011.

HARDELAND, R.; POEGGELER, B. **J. Pineal Res**, v.34, p.233– 241, 2003.

HARDELAND, R.; PANDI-PERUMAL, S.R. Melatonin. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**. v.38, n.3, p.313-316, 2006.

HESS, K.A.; CHEN, L.; LARSEN, W.J. Inter-alpha-inhibitor binding to hyaluronan in the cumulus extracellular matrix is required for optimal ovulation and development of mouse oocytes. **Biology of Reproduction**, v.6, p. 436–443, 1999.

HIRSHFIELD, A.N. Theca cells may be present at the outset of follicular growth. **Biol Reprod**, v.44, p.1157-1162, 1991.

HUETHER, G. The contribution of extrapineal site of melatonin synthesis to circulating melatonin levels in higher vertebrates. **Experientia**, v. 49, p.665–670, 1993.

HYTTEL, P.; FAIR, T.; CALLESEN, H.; GREVE, T. Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. **Theriogenology**, v.47, p.23-32, 1997.

IANAS, O.; OLNESCU, R.; BADESCU, I. Melatonin involvement in oxidative stress. Romanian **Journal of Endocrinology**, v.29, p. 147–153, 1991.

ISHIZUKA, B.; KURIBAYASHI, Y.; MURAI, K.; AMEMIYA, A.; ITOH, M.T. The effect of melatonin on in vitro fertilization and embryo development in mice. **Journal Pineal Research**, v.28, p.48-51, 2009.

ITOH, M.T.; ISHIZUKA, B.; KUDO, Y.; AMEMIYA, A.; FUSAMA, S.; AMEMIYA, A.; SUMI, Y. Detection of melatonin and serotonin *N*-acetyltransferase and hydroxyindole-

O-methyltransferase activities in rat ovary. **Molecular Cellular Endocrinology**, v.136, p.7-13, 1997.

ITOH, M.T.; ISHIZUKA, B.; KURIBAYASHI, Y.; AMEMIYA, A.; SUMI, Y. Melatonin, its precursors, and synthesizing enzyme activities in the human ovary. **Molecular Human Reproduction**, v.5, n.5, p.402-408, 1999.

KANG, J.T.; KOO, O.J.; KWON, D.K.; PARK, H.J.; JANG, G.; KANG, S.K.; LEE, B.C. Effects of melatonin on in vitro maturation of porcine oocyte and expression of melatonin receptor RNA in cumulus and granulosa cells. **Journal of Pineal Research**, v.46, p.22-28, 2009.

KAWAMURA, K.; KUMAGAI, J.; SUDO, S.; CHUN, S.Y.; PISARSKA, M.; MORITA, H.; TOPPARI, J.; FU, P.; WADE, J.D.; BATHGATE, R.A. Paracrine regulation of mammalian oocyte maturation and male germ cell survival. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.101, p.7323-7328, 2004.

KIM, B.K.; ANOWER, J.M.; KANG, S.R.; KIM, D.; CHANG-HEE, H.A.N.; HUH, M.K.; KAMAL, T. Effects of spermatozoa during in vitro meiosis progression in the porcine germinal vesicle oocytes. **Anim Reprod Sci**, v.104, p.83-92, 2008.

KNIJN, H.M.; GJORRET, J.O.; VOS, P.L.A.M.; HENDRIKSEN, P.J.M.; VAN DER WEIJDEN, B.C.; MADDOX-HYTTEL, P.; DIELEMAN, S.J. Consequences of *In Vivo* development and subsequent culture on apoptosis, cell number, and blastocyst formation in bovine embryos. **Biol. Reprod.** v.69(4), p.1371- 1378, 2003.

KORKMAZ, A., ROSALES-CORRAL, S., REITER, R.J. Gene regulation by melatonin linked to epigenetic phenomena. *Gene* 503, p.1–11. 2012.

KOWALTOWSKI, A.J.; VERCESI, A. E. Mitochondrial damage induced by conditions of oxidative stress. *Free Radical Biological Medicine*, v. 26, p. 463-471, 1999.

KUBELKA, M.; MOTLIK, J.; SCHULTZ, R.M.; PAVLOK, A. BUTYROLACTONE I. reversibly inhibits meiotic maturation of bovine oocytes, without influencing chromosome condensation activity. **Biol Reprod**, v.62, p.292-302, 2000.

LEHMKUHL, R.C.; MEZZALIRA, A.; VIEIRA, A.D.; BARBIERI, D P.; MACHADO, M F.; RUBIN, M.I.B.; SILVA, C.A.M. Viabilidade de oócitos bovinos mantidos em líquido folicular. **ARS Veterinária**, v.18, p. 273-279, 2002.

LI, R. et al. Oocyte- secret fator (s) determine functional differences between bovine mural granulosa cells and cumulus cells. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 63, p. 839-845, 2000.

LIM, H.; PARIA, B.C.; DAS, S.K.; DINCHUK, J.E.; LANGENBACH, R.; TRZASKOS, J.M.; DEY, S.K. Multiple female reproductive failures in cyclooxygenase 2-deficient mice. **Cell**, v.91, p. 197–208, 1997.

LIU, L.; TRIMARCHI, J.R.; NAVARRO, P.; BLASCO, M.A.; KEEFE, D.L.; Oxidative stress contributes to arsenic-induced telomere attrition, chromosome instability, and apoptosis. **J Biol Chem**, v.278, p.1998-2004, 2003.

LOIOLA, M.V.G. Validação de um programa de produção *in vitro* de embriões bovinos com transporte de oócitos e de embriões por longas distâncias. 2013. 98f Dissertação de Mestrado em Reprodução Animal (Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia), Universidade Federal da Bahia- Salvador.

LONERGAN, P.; RIZOS, D.; WARD, F.; BOLAND, M.P. Factors influencing oocyte and embryo quality in cattle. **Reprod. Nutr. Dev**, v.41, p.1-11, 2001.

MACCHI, M.M.; BRUCE, J.N. Human pineal physiology and functional significance of melatonin. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v. 25, p. 177–195, 2004.

MAGANHIN, C.C.; CARBONEL, A.A.F.; HATTY, J.H.; FUCHS, L.F.P.; OLIVEIRA-JÚNIOR, I.S.; SIMÕES, M.J. Efeitos da melatonina no sistema genital feminino: breve revisão. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 54, p. 267-271, 2008.

MANJUNATHA, B.M.; DEVARAJ, M.; GUPTA, P.S.P.; RAVINDRA, J.P.; NANDI, S. Effect of taurine and melatonin in the culture medium on buffalo *in vitro* embryo development. **Reproduction in Domestic Animals**, v.44, p.12-16, 2009.

MCDONALD, L.E. **Veterinary endocrinology and reproduction**. 4rh ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 571p. 1989.

MATZUK, M.M.; BURNS K.H.; VIVEIROS, M.M.; EPPIG, J.J.; Intercellular communication in the mammalian ovary: oocytes carry the conservation. **Science**, v.296, p.2178-2190, 2002.

MAYO, J.C.; SAINZ, R.M.; URIA, H.; ANTOLIN, I.; ESTEBAN, M.M.; RODRIGUEZ, C. Melatonin prevents apoptosis induced by 6-hidroxydopamine in neuronal cells: Implications for Parkinson Disease. **J.Pineal Res**, v. 24 (3), p.92-179, 1998.

MEHLLMANN, L. M. Stops and starts in mammalian oocytes: recent advances in understanding the regulation of meiotic arrest and oocyte maturation. **Reproduction**, Cambridge, v.130, p. 791-799, 2005.

MESQUITA, L.G.; Influência da depleção e suplementação mitocondrial no processo de apoptose embrionária, 2010. 97f. Dissertação de doutorado em Zootecnia. (Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos) Universidade de São Paulo-Pirassununga.

MILLER, J.B.; RUSSELL, The cdc 25 m-phase inducer: an unconventional protein phosphatase. **Cell**, v.68, p.407-410, 1992.

MORADO, S.A.; CETICA, P.D.; BECONI, M.T.; DALVIT, G.C. Reactive oxygen species in bovine oocyte maturation in vitro. **Reprod Fertil Dev**, v.21, p.608-614, 2009

MOTLIK, J.; PAVLOK, A.; KUBELKA, M.; KALOUS, J.; KALAB, P. Interplay between cdc2 kinase and MAP kinase pathway during maturation of mammalian oocytes. **Theriogenology**, v.49, p.461-469, 1998.

NA, K.; KIM, J., LEE, J., YOON, T., CHA, K., LEE, D. Effect of melatonin on the maturation of mouse GV oocytes and apoptosis of cumulus cells *in vitro*. **Fertil Steril**, v.84, 103 p., 2005.

NAKAMURA, Y.; TAMURA, H.; TAKAYAMA, H.; KATO, H. Increased endogenous level of melatonin in preovulatory human follicles does not directly influence progesterone production. **Fertility and Sterility**, v.80 (.4), p.1012-1016, 2003.

NAKANO, M.; KATO, Y.; TSUNODA, Y. Effect of melatonin treatment on the developmental potential of parthenogenetic and somatic cell nuclear-transferred porcine oocytes *in vitro*. **Zygote**, v.20, p.199-20, 2012. Achar 2011.

NASCIMENTO, E.F.; SANTOS, R.L. Patologia da Reprodução dos Animais Domésticos. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 137p. 2003.

NAVARRO, P.A.; LIU, L.; FERRIAN, I. R.A.; KEEFE, D.L. Arsenite induces aberrations in meiosis that can be prevented by coadministration of N-acetylcysteine in mice. **Fertil Steril**, v.85, p.1187-1194, 2006.

NICOLAU, S.S. Estudo da ação antioxidante da melatonina em embriões bovinos frescos e criopreservados produzidos in vitro, 2012. 101f. Dissertação de mestrado em Ciências (Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia)- Universidade da São Paulo, São Paulo

NILES, L.P.; WANG, J.; SHEN, L.; LOBB, D.K.; YOUNGLAI, E.V. Melatonin receptor mRNA expression in human granulosa cells. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 156, p. 107–110, 1999.

PANDI-PERUMAL, S.R. et al. Melatonin: Nature's most versatile biological signal? **The FEBS Journal**, v. 273 (13), p. 2813-38, 2006.

PAPIS, K.; POLESZCZUK, O.; WENTA-MUCHAISKI, E.; MODINKKI, J.A. Melatonin effect on bovine embryo development *in vitro* in relation to oxygen concentration. **Journal of Pineal Research**, v.43, p.321-326, 2007.

PARK, E.; LEE, D.; CHO, J.; HAN, J.; CHA, K.; YOON, T. Addition of melatonin in *in vitro* maturation (IVM) medium increases maturation and fertilization of immature human oocytes. **Fertility and Sterility**, v.86, p.168, 2006.

PAVLOK, A.; LUCAS-HAHN, A.; NIEMANN, H. Fertilization and developmental competence of bovine oocytes derived from different categories of antral follicles. **Mol Reprod Develop**, v.31, p.63-67, 1992.

PICTON, H.M.; BRIGGS, D.; GOSDEN, R. The molecular basis of oocyte growth and development. **Mol Cell Endocrinol**, v.145, p.27-37, 1998.

PONTES, J.H.F.; NONATO-JUNIOR, I.; SANCHES, B.V.; ERENO-JUNIOR, J.C.; UVO, S.; BARREIROS, R.R.; OLIVEIRA, J.A.; HASLER, J.F.; SENEDA, M. M. Comparison of embryo yield and pregnancy rate between *in vivo* and *in vitro* methods in the same Nelore (*Bos indicus*) donor cows. **Theriogenology**, v. 71, p. 690-700, 2009.

PONTES, J.H.F.; STERZA, F.A.M; BASSO, A.C.; FERREIRA, C.R.; ANCHES, B.V.; RUBIN, K.C.P.; SENEDA, M.M. Ovum pick up, *in vitro* embryo production, and pregnancy rates from a large-scale commercial program using Nelore cattle (*Bos indicus*) donors. **Theriogenology**, v. 75, p. 1640-1646, 2011.

PORCIUNCULA, P.M. Ativação partenogênica de oócitos bovinos jovens com ionomicina e 6-dimetilaminopurina associado ou não ao estrôncio. 2007. 80f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga

PRENTICE-BIENSCH JR, SINGH J, ALFOTEISY B, ANZAR M. Simple and high-throughput method to assess maturation status of bovine oocytes: Comparison of anti-lamin A/C-DAPI with an aceto-orcein staining technique. **Theriogenology** 78 (2012) 1633–1638.

RAMOS, E.M.; CAVALCANTE, T.V., NUNES, R.R.M., OLIVEIRA, C.M., SILVA, S.M.M.S., DIAS, F.E.F., MARUO, V.M., ARRIVABENE, M. Morfometria ovariana de vacas zebuínas criadas na Amazônia Oriental. **Rev. Bras. Saúde Prod. An.**, v.9 (4), p. 696-702, 2008.

REITER, R.J. Melatonin: Lowering the High Price of Free Radicals. **News Physiol. Sci.** v.15, p.246-250, 2000.

REITER, R.J.; TAN, D.X., GITTO, E.; SAINZ, R.M.; MAYO, J.C.; LEON, J.; MANCHESTER, L.C.; VYAYALAXMI; KILIC, E.; KILIC, U. Pharmacological utility of melatonin in reducing oxidative cellular and molecular damage. **Pol J. Pharmal.** v.56 (2), p. 70-156. 2004.

REITER, R.J.; TAN, D.X.; MANCHESTER, L.C.; PAREDES, S.D.; MAYO, J.C.; SAINZ, R.M. Melatonin and reproduction revisited. **Biology of Reproduction**, v.81, p.445–456, 2009.

REITER, R.J.; ROSALES-CORRAL, S.A.; MANCHESTER, L.C.; TAN, D.X. Peripheral reproductive organ health and melatonin: ready for prime time. **Int. J. Mol. Sci.** v. 14, p.7231-7272. 2013.

RICHARDS. Maturation of ovarian follicles: actions and interactions of pituitary and ovarian hormones on follicular cell differentiation. **Physiological Reviews**, v. 60, p. 51-89, 1980.

RIZOS, D.; FAIR, T.; PAPADOPOULOS, S.; BOLAND, M.; LONERGAN, P. Developmental, qualitative, and ultrastructural differences between ovine and bovine embryos produced *in vivo* or *in vitro*. **Mol. Reprod. Dev.**, v.62, p.320-327, 2002.

ROCHA, R.M.P.; MATOS, M.H.T.; LIMA, L.F.; Saraiva, M.V.A.; Alves, A.M.C.V.; Rodrigues, A.P.R.R.; Figueiredo, J.R. Melatonina e reprodução animal: implicações na fisiologia ovariana. **Acta Veterinaria Brasilica.** v.5,p.147-157, 2011.

RODRIGUEZ, C., MAYO, J.C., SAINZ, R.M., ANTOLIN, I.; HERRERA, F., MARTIN, V., REITER, R.J. Regulation of antioxidant enzymes: A significant role for melatonin. **J. Pineal.** v.36, p.1–9, 2004.

RODRIGUEZ-NARANJ, M. I.; GIL-IZQUIERDO, A.; TRONCOSO, A. M.; CANTOS-VILLAR, E.; GARCIA-PARRILLA, M. C. Food Chem., v.126, p. 1608–1613, 2011.

RODRIGUEZ-OSÓRIO, N.; KIM, I.J.; WANG, H., et al. Melatonin increases cleavage rate of porcine preimplantation embryos *in vitro*. **J.Pineal Res**, v. 43, p. 283-288, 2007.

RÖNNBERG, L.; KAUPPILA, A.; LEPPALUOTO, J.; MARTIKAINEN, H.; VAKKURI, O. Circadian and seasonal variation in human preovulatory follicular fluid melatonin concentration. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v.71, p.493-496, 1990.

RÜSSE, I.; Oogenesis in cattle and sheep. **Bibl Anat**, v.24, p.77-92, 1983.

SALUSTRI, A. ET AL. Hyaluronic acid synthesis by granulosa cells and cumulus cells *in vitro* is selectively stimulated by a factor produced by oocytes and by transforming growth factor-B. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, Md, US, v.265 (32), p. 19517-19523, 1990.

SAMPAIO, R.V.; CONCEIÇÃO, S.D.; MIRANDA, M.S. SAMPAIO, L.S.; OHASHI, O.M. MT3 melatonin binding site, MT1 and MT2 melatonin receptors are present in oocyte, but only MT1 is present in bovine blastocyst produced *in vitro*. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 10, p. 103, 2012.

SAVIO, J.D.; KEENAN, L.; BOLAND, M.P. ROCHE JF. Patter of growth of dominant follicles during oestrus cycle in heifers. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.83, p. 71-663, 1988.

SENEDA, M.M.; ESPER, C.R.; GARCIA, J.M.; ANDRADE, E.R. Aspectos técnicos e biológicos da obtenção de oócitos bovinos: revisão de literatura. **Semina: Ciências Agrárias**, v.23 (1), p. 101-110, 2002.

SETYANINGSIH, W.; PALMA, M.; BARROSO, C.G. **Journal of Cereal Science**, vol. 56. p. 340-346, 2012.

SHI, J.M.; TIAN, X.Z.; ZHOU, G.B.; WANG, L.; GAO, C.; ZHU, S.E.; ZENG, S.M.; TIAN, J.H.; LIU, G.S. Melatonin exists in porcine follicular fluid and improves *in vitro* maturation and parthenogenetic development of porcine oocytes. **Journal of Pineal Research**, v.47, p.318–323, 2009.

SHIDA, C.S.; CASTRUCCI, A.M.L.; LAMY-FREUND, M.T. High melatonin solubility in aqueous medium. **J.Pineal Res**, v 16, p. 198-2005, 1994.

SHIMADA, M.; ZENG, W.X.; TERADA, T. Inhibition of PI 3-kinase or MEK leads to suppression of p34cdc2 kinase activity and meiotic progression beyond the MI stage in porcine oocytes surrounded with cumulus cell. **Biol Reprod**, v.65, p.442-448, 2001.

SILVA, L.K.X.; REIS, A.N.; SILVA, A.O.A.; SOUSA, J.S.; SOUZA, A.J.O.; VALE, W.G. Transporte de oócitos bovinos em meio de maturação por diferentes períodos de tempo sem controle da atmosfera gasosa. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 63 (1), p. 74-80, 2011.

SIRARD, M.A.; COENEN, K.; BILODEAU, S. Effects of fresh or cultured follicular fractions on meiotic resumption in bovine oocytes. **Theriogenology**, v.37, p.39-57, 1992.

SMITZ, J.E.J. Cortvrindt RG. The earliest stages of folliculogenesis *in vitro*. **Reproduction**, v.123, p.185-202, 2002.

SOARES, J.M.J.R.; MASANA, M.I.; ERSAHIN, C.; DUBOCOVICH, M.L. Functional melatonin receptors in rat ovaries at various stages of the estrous cycle. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 306, p. 694–702, 2003.

SZOLLOSI, D. OOCYTE MATURATION. IN: THIBAUT, C.; LEVASSEUR, M.C.; HUNTER, R.H.F. **Reproduction in mammals and man**. Paris, Ellipses, cap16, p.307-325, 1993.

SQUIRES, E.L. Maturation and fertilization of equine oocytes. **Vet Clin North Am Equine Pract**, v.12, p.31-45, 1996.

TAKADA, L.; MARTINS JUN, R. A.; MINGOT, G.Z.; BALIEIRO, J.C.B.; COELHO, L.A. Melatonin in maturation media fails to improve oocyte maturation, embryo development rates and DNA damage of bovine embryos. **Scientia Agricola**, v.67, n.4, p.393-398, 2010.

TAKAMI, M.; PRESTON, S.; BEHRMAN, H.R. Eicosatetraenoic and eicosatrienoic acids, lipoxygenase inhibitors, block meiosis via antioxidant action. **Am J Physiol Cell Physiol**, v.278, p.646-650, 2000.

TAKAHASHI, M.. Oxidative stress and redox regulation in vitro development of mammalian embryos. **Journal of reproduction and development**, v.58 (1), p. 1-9, 2012.

TAMURA, H.; TAKETANI, T.; MATSUOKA, A.; YAMAGATA, Y.; SHIMAMURA, K.; MARIOKA, H.; ISHIKAWA, H.; REITER, R.J. Oxidative stress impairs oocyte quality

and melatonin protects oocytes from free radical damage and improves fertilization rate. **Journal of Pineal Research**, v.44, p.280-287, 2008.

TAMURA, H.; NAKAMURA, Y.; KORKMAZ, A.; MANCHESTER, L.C.; TAN, D.X.; SUGINO, N.; REITER, R.J. Melatonin and the ovary: physiological and pathophysiological implications. **Fertility and Sterility**, v. 92, p. 328-343, 2009.

TAMURA, H.; TAKASAKI, A.; TAKETANI, T.; TANABE, M.; KIZUKA, F.; LEE, L.; TAMURA, I.; MAEKAWA, R.; AASADA, H.; YAMAGATA, Y.; SUGINO, N. The role of melatonin as an antioxidant in the follicle. **J. Ovarian Res**, v. 25, p.5-5, 2012.

TANGHE, S. ET AL. Minireview: Functions of the cumulus oophorus during oocyte maturation, ovulation, and fertilization. **Molecular reproduction and development**, New York, v.61, p. 414-424, 2002.

TSANTARLIOTOU, ATTANASIO, L.; DE ROSA, A.; BOCCIA, L.; PELLERANO, G.; GASPARRINI, B. The effect of melatonin on bovine *in vitro* embryo development. **Italian Journal of Animal Science**, v.6, p.488-489, 2007.

VALASI, F.; TSILIGIANNI, T.; PAPANIKOLAOU, T.; DIMITRIADIS, I.; VAINAS, E.; SAMARTZI, F.; AMIRIDIS, G.S. Melatonin improves the developmental competence of sheep oocytes. ESDAR Annual Conference, Portoroz-Lipica, Slovenia, p. 341, 2006.

VAN DER HURK, R.; ZHAO, J. Regulation of mammalian oocyte growth and maturation. **Acta Sci Vet**, v.31, p.188-205, 2003.

VAN DER HURK, R.; ZHAO, J. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. **Theriogenology**, v. 63, p.51- 717, 2005.

VAN SOOM, A. et al. Function of cumulus oophorus before and during mammalian fertilization. **Reproduction of Domestic Animals**, Berlin, v.37, p. 144-151, 2002.

VARAGO, F.C.; MENDONÇA, L.F.; LAGARES, M.A. Produção *in vitro* de embriões bovinos: estado da arte e perspectiva de uma técnica em constante evolução. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 32 (2), p. 100-109, 2008.

VIANA, J.H.M.; SIQUEIRA, L.G.B.; PALHAO, M.P.; CAMARGO, L.S.A. Use of *in vitro* Fertilization Technique in the Last Decade and its Effect on Brazilian Embryo Industry and Animal Production. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 38 (2) p. 661- 674, 2010.

WANG, F.; TIAN, X.; ZHANG, L.; TAN, D.; REITER, R. J; LIU, G. Melatonin promotes the *in vitro* development of pronuclear embryos and increases the efficiency of

blastocyst implantation in murine. **Journal of Pineal Research**, v.55 (3), p.267-274, 2013.

WASSARMAN, P.M. AND ALBERTINI, D.F. The mammalian ovum. In *The Physiology of Reproduction*. Second Edition (E. Knobil and J.O. Neill, Eds.). Raven Press, Ltd., New York. p.79-122,1994.

WEBLEY, G.E.; LUCK, M.R. Melatonin directly stimulates the secretion of progesterone by human and bovine granulosa cells in vitro. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 78, p.711–717, 1986.

WEI; DUO; ZHANG, C.; XIE, JUANKE.; SONG, X.; YIN, B.; LIU, Q.; HU, L.; HAO, H.; GENG, J. WANG, P. Supplementation with low concentrations of melatonin improves nuclear maturation of human oocytes *in vitro*. **J. Assist Reprod. Genet.**, v.30, p. 933-938, 2013.

WOO, M.M.M.; TAI, C.J.; KANG, S.K.; NATHWANI, P.M.; PANG, S.F.; LEUNG, P.C.K. Direct action of melatonin in human granulosa-luteal cells. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 86 (10), p. 4789–4797, 2001.

YONEI, Y.; TAKAHASHI, Y.; HIBINO, S. Effects of Melatonin: Basics Studies and Clinical Applications, v. 7, p.85-91, 2010.